

**Vergleich von zwei Nachweismethoden und ihrer differenzierten
Auswertung bei der akrosomalen Reaktion menschlicher
Spermatozoen**

**Vergleich von zwei Nachweismethoden und ihrer differenzierten
Auswertung bei der akrosomalen Reaktion menschlicher
Spermatozoen**

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christina Maria Thomas
aus Gießen

Gießen 2001

Aus dem Medizinischen Zentrum für Dermatologie und Andrologie

Leiter: Prof. Dr. med. Dr. med. habil. W.-B. Schill
des Universitätsklinikums Gießen

Gutachter: PD Dr. F. Köhn

Gutachter: Prof. Dr. Dr. M. Kirschbaum

Tag der Disputation: 9. April 2002

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung

1.1	Einführung	1
1.2	Zielsetzung der Arbeit	3
1.3	Grundlagen	4
1.3.1	Das Akrosom	4
1.3.2	Veränderungen des Spermatozoons im weiblichen Genitaltrakt	5
1.3.2.1	Kapazitation	5
1.3.2.2	Akrosomale Reaktion	7
1.3.3	Penetration und Fusion der Spermatozoen mit der Eizelle	9

2 Material und Methoden

2.1	Patienten- und Spenderauswahl	11
2.2	Gewinnung und Aufbereitung der Ejakulate	11
2.2.1	Bestimmung der Spermatozoenkonzentration	11
2.2.2	Bestimmung der Motilität	12
2.2.3	Glaswollfiltration	12
2.3	Medien	12
2.3.1	Human tubal fluid medium (HTF Medium)	12
2.3.2	Herstellung des PBS-Puffers	13
2.3.3	Herstellung des Antioxidationsmittels	13
2.4	Kapazitation und Auslösung der akrosomalen Reaktion	13
2.4.1	Calcium Ionophor A23187	14
2.4.2	Dimethylsulfoxid (DMSO)	14
2.4.3	Dibutyryl Adenosin 3',5'- zyklisches Monophosphat (dbcAMP)	14
2.5	Markierung der Spermatozoen	16
2.5.1	Supravitalfärbung	16
2.5.2	Markierung mit fluoreszierenden Lektinen	16
2.5.2.1	FITC labeled Pisum sativum agglutinin (FITC-PSA)	16

2.5.2.2	FITC labeled Concanavalin A (FITC-ConA)	17
2.6	Auszählung der markierten Spermatozoen	18
2.6.1	Auszählung der mit FITC-ConA markierten Spermatozoen	18
2.6.2	Auszählung der mit FITC-PSA markierten Spermatozoen	18
2.7	Intraindividuelle Reproduzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei fertilen Spendern	22
2.8	Vergleich der akrosomalen Reaktion mit Fertilisationsraten bei In-vitro-Fertilisation	22
2.10	Statistik	22

3 Ergebnisse

3.1	Vergleich zwischen FITC-PSA und FITC-ConA	23
3.1.1	Vergleich der Ergebnisse von FITC-PSA und FITC-ConA nach Induktion der akrosomalen Reaktion mit Ionophor A23187	24
3.1.2	Vergleich der Ergebnisse von FITC-PSA und FITC-ConA nach Induktion der akrosomalen Reaktion mit dbcAMP	29
3.1.3	Vergleich der Induktion der akrosomalen Reaktion mit Ionophor A23187 bzw. dbcAMP	32
3.2	Intraindividuelle Reproduzierbarkeit der akrosomalen Reaktion	36
3.3	Vergleich der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion mit IVF- Fertilisationsraten	41

4 Diskussion

4.1	Vergleich zwischen FITC-PSA und FITC-ConA	48
4.1.1	Bedeutung der Diagnostik der akrosomalen Reaktion und Auswahl der Lektine	48
4.1.2	Lektine	50
4.1.3	Vergleich der Anzahl akrosomal reagierter Spermatozoen bei Markierung mit FITC-ConA und FITC-PSA	50

4.1.4	Differenzierung zwischen teilweise und vollständig akrosomal reagierten Spermatozoen	52
4.1.5	Induktion der akrosomalen Reaktion mit verschiedenen Induktoren	55
4.1.6	Schwierigkeiten bei der Auszählung der markierten Spermatozoen	57
4.2	Intraindividuelle Schwankungen der akrosomalen Reaktion	57
4.3	Korrelation der Induktion der akrosomalen Reaktion mit Fertilisationsraten nach IVF	58
4.4	Schlußfolgerungen	65
5	Zusammenfassung	67
6	Literaturverzeichnis	71
7	Danksagung	83
8	Lebenslauf	84

1. Einleitung

1.1 Einführung

Nach den Kriterien der European Society of Human Reproduction and Embryology (ESHRE) und der Weltgesundheitsorganisation (WHO) besteht Infertilität, wenn eine Schwangerschaft trotz ungeschützten Geschlechtsverkehrs nach 1-2 Jahren nicht eingetreten ist (ESHRE 1998, WHO 1993).

In Deutschland leben laut Statistischem Jahrbuch von 1998 ca. 37,8 Millionen Paare. Man schätzt, daß ungefähr 10-15% dieser Paare ungewollt kinderlos sind.

In seiner Studie beschreibt Bruckert (1991) eine Zahl von 585.000 ungewollt kinderlosen Paaren in Deutschland, wobei er von ca. 6,8 Millionen Paaren im fertilen Alter ausgeht. Dies würde einer Sterilitätsrate von ca. 9% entsprechen.

Die WHO geht von 50-80 Millionen Menschen weltweit mit eingeschränkter Fertilität aus. Jährlich schätzt man die Zahl neuer, infertiler Paare auf ca. 2 Millionen weltweit (WHO 1993).

Kinderlosigkeit hat viele Ursachen, die sowohl beim Mann als auch bei der Frau oder bei beiden Partnern liegen können. In der Literatur finden sich unterschiedliche Angaben bezüglich der statistischen Verteilung. So werden andrologische Sterilitätsfaktoren in 25-40%, gynäkologisch bedingte Infertilität in 40-50% und Sterilitätsfaktoren bei beiden Partnern gleichzeitig in ca. 20% der Fälle beschrieben (Bruckert 1991, Freundl und Tiggers 1995, American Society for Reproductive Medicine 1998).

Die Infertilität des Mannes äußert sich überwiegend in einer reduzierten Ejakulatqualität, welche mittels der Standardparameter gemäß WHO (Tab.1) gemessen werden kann (Haidl und Schill 1992, WHO Handbuch 1999).

Starke intraindividuelle Schwankungen bei Ejakulatparametern von fertilen Männern sind aber bekannt (Cooper et al. 1991). Die WHO empfiehlt daher mindestens zwei Spermiogramme im Abstand von 1-3 Wochen als Kontrolle.

Tab.1: Normwerte der Standardparameter für Spermioogramme (WHO 1999)

Ejakulatvolumen	$\geq 2,0$ ml	PH	$> 7,2$
Spermatozoen-Konzentration	$\geq 20 \times 10^6$ /ml	Anzahl Spermatozoen Gesamt	$\geq 40 \times 10^6$ / Ejakulat
Motilität	$\geq 50\%$ Kategorie a/b $\geq 25\%$ Kategorie a	Morphologie	Keine einheitliche Angabe von Grenzwerten
Anteil lebender Spermatozoen	$\geq 75\%$		

Zusätzlich gelten Messungen von Spermatozoenfunktionen als wichtige Parameter für die Fertilität (Liu und Baker 1992).

Sie umfassen unter anderem akrosomale Reaktion, Bindung an die Zona pellucida, Fusion mit der Oozyte und Chromatinkondensation.

Als akrosomale Reaktion bezeichnet man eine strukturelle Veränderung im Bereich des Spermatozoonkopfes, bei der es durch Fusionierung und Fenestrierung zum Verlust der äußeren akrosomalen Membran und der Plasmamembran und damit zur Freisetzung des akrosomalen Inhaltes kommt.

Vor allem der Prozentsatz der Induktion der akrosomalen Reaktion spielt bei der Bewertung des akrosomalen Status eine essentielle Rolle, da die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion mit der Fertilität des Mannes assoziiert ist (Töpfer-Petersen et al. 1985, Calvo et al. 1989, Fénichel et al. 1991, Cummins et al. 1991).

Nur vollständig akrosomal reagierte Spermatozoen binden an die Plasmamembran der Eizelle, da nur diese Spermatozoen in der Lage sind, die Zona pellucida zu durchdringen (Yanagimachi 1981, Talbot und Chacon 1982, Byrd und Wolf 1986, Aitken 1990).

Ohne ein morphologisch und funktionell intaktes Akrosom ist also eine Fusion des Spermatozoons mit der Eizelle nicht möglich (Schill et al. 1988).

Diese Ausführungen zeigen, daß Kenntnisse über die Ursachen akrosomaler Schäden und den Prozentsatz der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion eine wichtige Voraussetzung bei der Infertilitätsdiagnostik von Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch sind (Schill et al. 1988, Liu und Baker 1990a).

Dazu sind zuverlässige, reproduzierbare und einfach durchzuführende Tests notwendig, um diese Vorgänge quantitativ und qualitativ zu messen.

1.2 Zielsetzung der Arbeit

- Vergleich zweier Nachweismethoden der akrosomalen Reaktion.

Dabei wurden Markierungen mit zwei fluoreszierenden Lektinen (FITC-PSA und FITC-ConA) gewählt, weil diese Methoden leicht durchführbar und für die Routinediagnostik einsetzbar sind.

Die akrosomale Reaktion menschlicher Spermatozoen wurde durch zwei verschiedene, bereits ausreichend bekannte Stoffe (Ionophor A23187 und dbcAMP) induziert und mit dem Anteil spontan akrosomal reagierter Spermatozoen verglichen.

- Differenzierung des akrosomalen Status in „teilweise“ oder „vollständig“ akrosomal reagierte Spermatozoen und Untersuchung des quantitativen Unterschiedes der mit den oben genannten Methoden erzielten Ergebnisse.
- Überprüfung der klinischen Relevanz dieser differenzierten Auswertung durch Korrelation mit den Fertilisationsraten im IVF-Programm.
- Untersuchungen zur intraindividuellen Variabilität der akrosomalen Reaktion bei fertilen Spendern.

1.3 Grundlagen

1.3.1 Das Akrosom

Menschliche Spermatozoen sind hochspezialisierte Zellen. Sie weisen eine große Anzahl an Fähigkeiten auf, wie z.B. Beweglichkeit, Erkennung anderer Zellen, Sekretion und Veränderungen bzw. Fusionen der Plasmamembran mit dem Ziel der Fertilisation weiblicher Eizellen (Aitken 1990).

Die wichtigsten Regionen reifer Spermatozoen teilen sich in Kopf, Mittelstück und Schwanz auf. Dabei besteht der Spermatozookopf aus Nucleus, Akrosom und postakrosomaler Region. Im Mittelstück befinden sich Mitochondrien, die der Energieversorgung dienen. Der Schwanz teilt sich in Haupt- und Endstück und dient der Fortbewegung.

Das Akrosom ist ein abflachender membrangebundener Vesikel, der sich in der anterioren Region des Spermatozookopfes befindet (Virtanen et al. 1984, Zamboni 1987).

Es kann mit einem sekretorischen Vesikel verglichen werden, in dem digestive Enzyme gespeichert sind. Diese gelangen durch einen der Exozytose ähnlichen Prozeß nach außen, wenn die Zelle das nötige Signal erhält (Yanagimachi 1981, Sidhu und Guraya 1989).

Das Akrosom wird zum Zellinneren von der inneren akrosomalen Membran begrenzt, die sich über der Kernmembran befindet. Die externe Begrenzung bildet die äußere akrosomale Membran; dazwischen liegt der akrosomale Inhalt.

Innere und äußere akrosomale Membran verbinden sich zum äquatorialen Segment (Virtanen et al. 1984).

Alle Teile des Spermatozoons werden von außen durch die Plasmamembran begrenzt, wobei ein schmaler Zytosolstreifen zwischen äußerer akrosomaler Membran und Plasmamembran liegt (Zaneveld et al. 1991).

Der akrosomale Inhalt besteht aus verschiedenen Enzymen. Dazu gehören Hyaluronidasen, Neuraminasen, saure Phosphatasen, Esterasen und vor allem Akrosin, eine Serinproteinase, die eine essentielle Rolle während der Penetration der Spermatozoen in die Eizelle spielt (Sidhu und Guraya 1989).

Akrosin liegt in seiner inaktiven Form als Proakrosin vor und wird durch biochemische Veränderungen während der Kapazitation bzw. akrosomalen Reaktion aktiviert (Aitken 1990, Zaneveld et al. 1991).

1.3.2 Veränderung des Spermatozoons im weiblichen Genitaltrakt

1.3.2.1 Kapazitation

Als Kapazitation werden biochemische und biophysische Veränderungen der Spermatozoen bezeichnet, welche die akrosomale Reaktion ermöglichen (Yanagimachi 1981, Bedford 1983, Chang 1984, Sidhu und Guraya 1989, De Jonge et al. 1989). Sie finden während des Spermatozoentransportes im weiblichen Genitaltrakt statt, und werden erst beim Erreichen der Eizelle beendet (Liu und Baker 1990a, Zaneveld et al. 1991).

Wichtige Veränderungen während der Kapazitation sind (nach Bedford 1983, Sidhu und Guraya 1989):

1. Modifikationen der Spermatozoenoberfläche und Plasmamembran
2. Erhöhter Calciumeinstrom
3. Veränderungen der Spermatozoenmotilität ("hyperaktive Spermatozoen" nach Yanagimachi (1981))

Diese Vorgänge sind reversibel (Zaneveld et al. 1991).

Da die Kapazitation in vivo erst im weiblichen Genitaltrakt ausgelöst wird, müssen im Seminalplasma "Dekapazitations"- oder "Akrosom stabilisierende"-Faktoren enthalten sein (Thomas et al. 1986, Sidhu und Guraya 1989).

Der erste Schritt der Kapazitation besteht also in einer Inaktivierung, Zerstörung oder chemischen Veränderung dieser inhibitorischen Faktoren.

Die einzelnen Membran- und biochemischen Vorgänge während der Kapazitation sind bis jetzt noch nicht vollständig erforscht.

Einige wichtige Veränderungen während der Kapazitation sind:

1. Intrazelluläre Erhöhung von Hydrogenperoxid (H_2O_2).
2. Calciumeinstrom in das Spermatozoon.
3. Zunahme des intrazellulären cAMP (White und Aitken 1989, Fraser und Monks 1990).
4. Aktivitätserhöhung von Phospholipase A_2 mit vermehrter Abspaltung oxidierter Fettsäuren, vor allem Lysophospholipide von Phospholipiden in der Spermatozoenmembran (Aitken et al. 1995, 1996).
5. Phosphorylierung von Tyrosin und anderen Proteinen (Aitken 1997).
6. Erhöhte Membranfluidität durch Cholesterinverlust (Cross 1996, 1998).
7. Verlust von Carbohydraten, vor allem Sialinsäuren, an der Oberflächenmembran mit Veränderung der Oberflächenladungen.

Durch diese intrazellulären Vorgänge wird das Zytoskelett der Spermatozoen modifiziert. Es kommt zu Veränderungen der Aktinfilamentstrukturen in der Plasmamembran und äußeren akrosomalen Membran.

Diese funktionellen Veränderungen bewirken instabile und vermehrt permeable Stellen entlang der Plasmamembran, so daß dort Fusionen der äußeren akrosomalen Membran mit der Plasmamembran, und damit die akrosomale Reaktion, initiiert werden können (Zaneveld et al. 1991).

Ein weiteres Phänomen ist ein verändertes Motilitätsmuster (Hyperaktivität) der Spermatozoen während bzw. nach Kapazitation (Yanagimachi 1981).

Dabei geht man davon aus, daß es durch die erhöhte Membranpermeabilität der Spermatozoen während der Kapazitation zu einer Erhöhung des intrazellulären Stoffwechsels und damit zu einer Zunahme der für die Bewegung benötigten Energie kommt (Sidhu und Guraya 1989).

1.3.2.2 Akrosomale Reaktion

Als akrosomale Reaktion bezeichnet man ein der Exozytose verwandtes Ereignis, das durch eine strukturelle Änderung der Membranen im Kopfbereich des Spermatozoons ausgelöst wird (Cross und Meizel 1989, De Jonge et al. 1989).

Durch die so freigesetzten lytischen Enzyme kann das Spermatozoon die Zona pellucida penetrieren und mit der Eizelle fusionieren (Yanagimachi 1981, Cross und Meizel 1989).

Hauptmerkmal der akrosomalen Reaktion ist die Fusion und Fenestrierung der Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran, so daß der akrosomale Inhalt freigesetzt wird. Schließlich ist so die innere akrosomale Membran exponiert.

Als Auslöser der akrosomalen Reaktion unter in-vivo-Bedingungen werden verschiedene Stoffe diskutiert. Dazu gehören Progesteron, Prostaglandine, Glycosaminoglykane, Phospholipide und Zona pellucida Glycoprotein 3 (Cross et al. 1988, De Jonge et al. 1988, Thomas und Meizel 1989, Zaneveld et al. 1991, Aitken 1997).

Die Spermatozoenveränderungen während der akrosomalen Reaktion lassen sich elektronenmikroskopisch gut darstellen (Nagae et al. 1986, Stock und Fraser 1987). Akrosomintakte Spermatozoen haben eine intakte Plasmamembranen, äußere akrosomale Membranen und eine elektronendichte akrosomale Matrix.

Folgende morphologische Vorgänge kennzeichnen die akrosomale Reaktion:

1. Zu Beginn der akrosomalen Reaktion schwillt der akrosomale Inhalt an, die Elektronendichte nimmt ab.
2. Vesikel entstehen durch Einstülpungen der äußeren akrosomalen Membran.
3. Im weiteren Verlauf vermindert sich die Vesikelanzahl trotz intakter Membranen. Die Plasmamembran bläht sich auf. Es kommt zur Fusion von Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran, die am anterioren Ende des äquatorialen Segmentes beginnt. Nun heben sich die beiden Membranen vom Spermatozoon ab und ihr größter Teil geht verloren.
4. Die innere akrosomale Membran liegt jetzt frei. Eventuell finden sich noch einige, an die innere Membran gebundene Vesikel und Reste der äußeren akrosomalen Membran.

Bei einem komplett akrosomal reagierten Spermatozoon fehlen die Plasma- und äußere akrosomale Membran mitsamt akrosomalem Inhalt komplett. Die innere akrosomale Membran bildet die äußere Begrenzung des Spermatozoons.

Auch Yudin et al. (1988) beschreiben die elektronenmikroskopischen Abläufe sehr ähnlich. Nach ihren Aussagen kommt es nach Anschwellung des Akrosoms zur Fusion der Plasmamembran mit der äußeren akrosomalen Membran. Diese beginnt in der anterioren Kopfregion und schreitet bis zum äquatorialen Segment fort. Die fusionierten Membranen werden fenestriert und lösen sich auf.

Die Vorgänge auf molekularer Ebene während der akrosomalen Reaktion sind noch nicht vollständig geklärt.

Es lassen sich aber 2 wichtige Prozesse erkennen:

1. Erhöhung der Fluidität und damit Instabilität der Plasma- und äußeren akrosomalen Membranen (Aitken 1997). Hierbei spielen unter anderem eine intrazelluläre Calciumerhöhung und eine Thyrosinphosphorylierung als Auslöser eine wichtige Rolle.

Die durch sie aktivierte Phospholipase C hydrolysiert PIP_2 (1-Phosphatidyl-D-myo-inositol-4,5-bisphosphat), wodurch „Aktin trennende Proteine“ frei werden (De Jonge et al. 1989, 1991a, 1991b, Zaneveld et al. 1991, Niles and Cohen 1991). Diese binden an

membrangebundenes F-Aktin und depolymerisieren dieses (Spungin et al.1995, Spungin und Breitbart 1996). Der dadurch ausgelöste Stabilitätsverlust der akrosomalen Membran führt zu Fusion und Fenestrierung der Membranen.

2. Aktivierung von Akrosin aus seinen Vorstufen Proakrosin. Hierbei spielen sowohl ein intrazellulärer pH-Anstieg als auch die Aktivierung von Calmodulin durch Calciumeinfluß eine wichtige Rolle (Frenette et al.1989, Zaneveld et al.1991).

Das aktivierte Akrosin ermöglicht es dem Spermatozoon, durch seine proteolytischen Eigenschaften die Zona pellucida zu penetrieren (Meizel 1984, Thomas et al. 1986).

1.3.3 Penetration und Fusion der Spermatozoen mit der Eizelle

Als Befruchtung wird ein Vorgang bezeichnet, der mit der Bindung des Spermatozoons an die Oozyte beginnt und mit der Verschmelzung des Ei- und Spermatozoenkerns endet (Moore 1990).

Essentielle Phasen dieser Fertilisation sind die Penetration des Spermatozoons durch die Hüllen der Eizelle und schließlich die Fusion des Spermatozoennukleus mit der Eizelle.

Zu den die Eizelle umgebenden Schichten gehören (von außen nach innen) Corona radiata, Zona pellucida und Oolemma (Vitelline Membran, Plasmamembran).

Die Zona pellucida ist eine hochdifferenzierte, azelluläre Struktur, die vor allem aus Glykoproteinen, besonders Carbohydraten besteht (Henderson et al. 1988).

Zur Penetration dieser Schichten muß das Spermatozoon verschiedene Eigenschaften besitzen:

1. eine progressive Motilität und
2. eine vollständige akrosomale Reaktion mit Freisetzung des akrosomalen Inhaltes.

Nach Passage der Corona radiata bindet das Spermatozoon mit seiner Plasmamembran an Rezeptoren des Zona pellucida Glykoproteins (ZP3) (Sathananthan et al. 1982, Florman und Wassarman 1985, Aitken 1990, Barros et al. 1996).

Hierdurch wird die akrosomale Reaktion initiiert.

Eine essentielle Rolle während der nun folgenden Penetration der Zona pellucida spielt Akrosin.

Diese Trypsin ähnliche Protease kommt an zwei Stellen im Spermatozoon vor:

1. Akrosin ist an der Oberfläche des Spermatozoonkopfes lokalisiert (Zaneveld et al. 1991). Man geht davon aus, daß dieses Akrosin durch seine fruktosebindenden Komponenten eine hohe Affinität zur Zona pellucida besitzt und deshalb zur Bindung des Spermatozoon an das ZP3 notwendig ist (Töpfer-Petersen und Henschen 1988, Williams und Jones 1991, Aitken und Brindle 1993, Moreno et al. 1998).
2. Inaktiviertes Akrosin befindet sich im Akrosom und wird durch die akrosomale Reaktion aktiviert und freigesetzt (Tesarik et al. 1988a, siehe auch 1.3.2.2).
Das intraakrosomale Akrosin bewirkt durch seine proteolytischen Eigenschaften eine lokale Auflösung der Zona pellucida (Thomas et al. 1986, Moreno et al. 1998).

Nachdem das Spermatozoon die Eischichten penetriert hat, bindet es an die Oolemma. Die Zellmembranen verschmelzen miteinander und das Spermatozoon dringt in das Zytoplasma der Oozyte ein. Dabei ist nur ein akrosomal reagiertes Spermatozoon in der Lage, an die Oolemma zu binden und zu fusionieren (Yanagimachi 1981, 1988, Aitken 1990).

Das nach der akrosomalen Reaktion freiliegende äquatoriale Segment erhält durch Veränderungen seiner Membranstruktur eine erhöhte Permeabilität und kann so mit der Oolemma leichter fusionieren (Aitken 1990). Auch hier spielt vermutlich das freigesetzte Akrosin eine entscheidende Rolle, da es die Bindung zwischen Spermatozoon und Oolemma ermöglichen soll (Aitken 1990).

2. Material und Methoden

2.1 Patienten- und Spenderauswahl

Die Ejakulatproben stammten von Patienten des Zentrums für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen. Insgesamt wurden 96 Patienten untersucht, wobei nur Ejakulate mit einer Spermatozoenkonzentration von mindestens $5 \times 10^6/\text{ml}$ für die Experimente verwendet wurden.

35 Ejakulate stammten von gesunden, fertilen Spendern, wobei insgesamt 6 Spender über einen Zeitraum von 10-12 Monaten beobachtet wurden. Bei ihnen mußte eine Normozoospermie nach WHO-Kriterien vorliegen (WHO 1993).

Desweiteren wurde ein kleiner Teil der Ejakulate von Patienten des IVF-Programmes rekrutiert (31 Patienten).

2.2 Gewinnung und Aufbereitung der Ejakulate

Die Ejakulatproben wurden durch Masturbation in sterile Plastikgefäße gewonnen und nach Verflüssigung analysiert.

2.2.1 Bestimmung der Spermatozoenkonzentration

Zur Bestimmung der Spermatozoenkonzentration wurden die Proben mit 10%iger Natriumchloridlösung vermischt und ein Tropfen der Lösung auf einer Neubauer-Haemozytometer-Kammer mikroskopisch ausgezählt (40er Objektiv). Nach Multiplikation des Ergebnisses mit dem Konversionsfaktor (Korrekturfaktor für Haemozytometrie) wurde die Spermatozoenkonzentration in Millionen/ml angegeben (WHO 1993).

2.2.2 Bestimmung der Motilität

Die Motilität wurde durch Auszählung von 100 Spermatozoen aus dem Nativejakulat bei 40facher Vergrößerung mit dem Mikroskop bestimmt (WHO 1993).

2.2.3 Glaswollfiltration

Zur Selektion motiler Spermatozoen wurde eine Glaswollfiltration durchgeführt.

Dabei wurde die mit Glaswolle gefüllte Trennsäule (SpermFertil, Fa. Mello Ltd., Exeter, UK) zunächst mit 3 ml HTF Medium (Zusammensetzung siehe 2.3.1) gespült, um überschüssige Glaswolle auszuwaschen. Das Filtrat wurde verworfen. Im nächsten Schritt wurden 1,5 ml des zu untersuchenden Ejakulates durch die Glaswolle filtriert und anschließend das Säulenvolumen mit HTF Medium nachgespült.

Durch diese Methode erhöhte sich die Anzahl motiler Spermatozoen in der Suspension auf durchschnittlich 50-70% (Rhemrev et al. 1989).

Das so aufbereitete Ejakulat wurde mit einem gleichen Volumen HTF Medium vermischt und zweimal bei $300 \times g$ 10 Minuten zentrifugiert.

Der Überstand wurde abgesaugt und das Pellet in 2 ml HTF Medium resuspendiert. Danach wurden Motilität und Spermatozoenkonzentration erneut bestimmt.

2.3 Medien

2.3.1 Human tubal fluid medium (HTF Medium)

101,6 mM NaCl; 2,04 mM $\text{CaCl}_2 \times 2 \text{ H}_2\text{O}$; 0,37 mM KH_2PO_4 ; 25 mM Na HCO_3 ; 0,33 mM Na-Pyruvat; 100 U/ml Penicillin; 4,69 mM KCl; 0,20 mM $\text{MgSO}_4 \times 7 \text{ H}_2\text{O}$; 0,001% Phenolrot; 2,78 mM wasserfreie Glucose; 21,4 mM Na-Lactat (60% Sirup); 0,05 g/l Streptomycinsulfat wurden in ein Reagenzglas gegeben und mit Aqua dest. auf einen Liter aufgefüllt (Quinn et al. 1985).

Die Osmolarität des Gemisches wurde auf 280 mOsmol/l eingestellt (Abweichungen von +/- 10 mOsmol/l wurden dabei toleriert). Die Lösung wurde steril filtriert und bei 6°C gelagert. Vor Durchführung der Experimente wurde die Lösung im Wärmeschrank auf ca. 37°C erwärmt.

Zu 1 ml HTF Medium wurden 10 mg humanes Albumin (Human Albumin, ORHA 20/21, Behring) zugesetzt (Aitken et al. 1984).

2.3.2 Herstellung des PBS-Puffers

Zur Herstellung des PBS-Puffers wurden 9,0 g/l NaCl, 1,62 g/l Na₂HPO₄ *H₂O und 0,37 g/l KH₂PO₄ vermischt und auf 1 Liter mit Aqua dest. aufgefüllt. Der pH-Wert betrug 7,4.

2.3.3 Herstellung des Antioxidationsmittels

50 ml PBS-Puffer (siehe 2.3.2) wurden mit 50 ml Glycerin und 25 mg 1,4-Diazabicyclooktan vermischt und die Lösung im Kühlschrank gelagert.

Alle genannten Bestandteile der hergestellten Medien (2.3.1-2.3.3) wurden von der Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH (Deisenhofen, BRD) bestellt und entsprachen den Qualitätsansprüchen für Zellkulturen.

2.4 Kapazitation und Auslösung der akrosomalen Reaktion

Für die Experimente wurde in der Spermatozoensuspension eine Spermatozoenkonzentration von 5×10^6 /ml eingestellt. Danach wurde die Probe zu gleichen Teilen auf 4 Reagenzgläser verteilt.

Nach 3 Stunden Kapazitation bei 37°C wurde die akrosomale Reaktion mit Hilfe von Calcium Ionophor A23187 bzw. dbcAMP ausgelöst (De Jonge et al. 1989, Byrd et al. 1989, Köhn et al. 1997). Hierzu wurden die Proben eine Stunde mit Ionophor A23187 bzw. dbcAMP inkubiert.

Ein gleicher Teil der Ejakulatproben wurde mit DMSO bzw. ohne Substanz inkubiert, um so die Anzahl spontan akrosomal reagierter Spermatozoen zu ermitteln.

Zum Versuchsprotokoll siehe flow chart (Abb.1).

2.4.1 Calcium Ionophor A23187

Zur Herstellung des gebrauchsfertigen Calcium Ionophor wurden 10 mg Calcium Ionophor A23187 (Boehringer Mannheim Cal NO. 414603) in 2 ml Dimethylsulfoxid (DMSO) gelöst und zu je 10 µl in Eppendorf-Hütchen pipettiert. Diese wurden bei –20°C gelagert.

Vor Gebrauch wurden zu 10 µl dieser Lösung 90 µl HTF Medium zugefügt und 5,5 µl der entstandenen Lösung zu 500 µl Spermatozoensuspension zugesetzt.

Die Endkonzentration des Ionophor A23187 betrug 10 µM (Endkonzentration des DMSO: 0,1%).

2.4.2 Dimethylsulfoxid (DMSO)

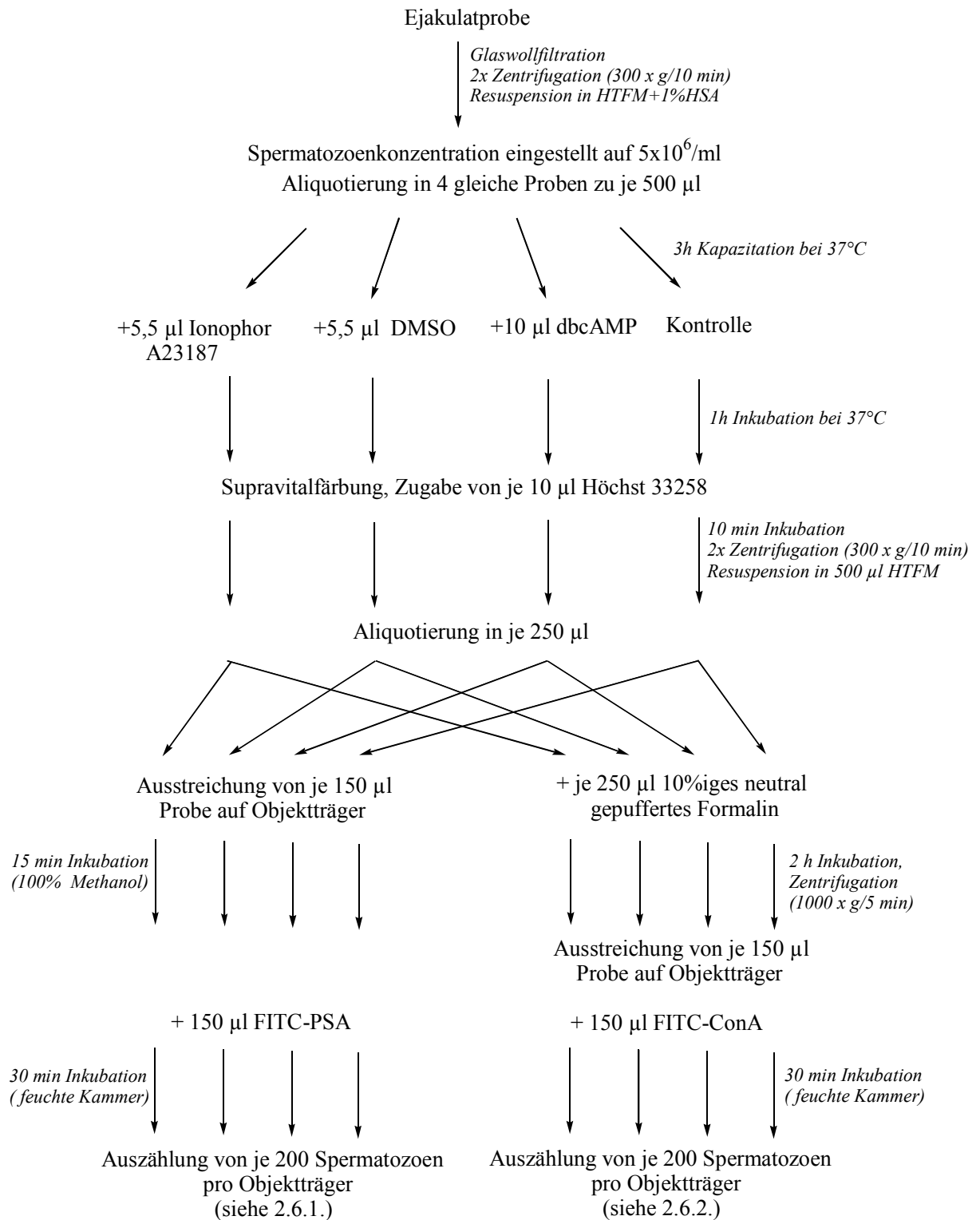
Zur Herstellung des gebrauchsfertigen DMSO wurden 10 µl DMSO (Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD) zu 90 µl HTF Medium gegeben. 5,5 µl der entstandenen Lösung wurden zu 500 µl Spermatozoensuspension zugesetzt.

Die Endkonzentration der Lösung betrug 0,1%.

2.4.3 Dibutyryl Adenosin 3',5'-zyklisches Monophosphat (dbcAMP)

Zur Herstellung des gebrauchsfertigen dbcAMP wurden 25 mg dbcAMP (Firma Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD) in 5 ml PBS-Puffer (siehe 2.3.2) gelöst. Je 100 µl Lösung wurden in ein Eppendorf-Hütchen pipettiert und bei –20°C gelagert.

Die Endkonzentration von dbcAMP in der Spermatozoensuspension betrug 1mM.



2.5 Markierung der Spermatozoen

Alle Proben wurden mit Hoechst 33258 (siehe 2.5.1) markiert, um zwischen lebenden und toten Spermatozoen differenzieren zu können.

2.5.1 Supravitalfärbung

Spermatozoen zeigen einen degenerativ bedingten Verlust des Akrosoms, wenn sie abgestorben sind (Cross et al. 1986, Cross und Meizel 1989, Mendoza et al. 1992).

Um eine physiologische akrosomale Reaktion lebender Spermatozoen von degenerativen akrosomalen Verlusten abgestorbener Spermatozoen zu unterscheiden, wurde eine Supravitalfärbung mit Höchst 33258 durchgeführt.

Zur Markierung wurde zu allen Proben Höchst 33258 in einer Konzentration von 50 µg/ml (Polysciences, Warrington, PA, USA) gegeben (Endkonzentration 1 µg/ml). Die Proben wurden 10 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert.

Zum Herauswaschen der überflüssigen Marker wurden die Proben zweimal 10 min bei 300 × g zentrifugiert und das Pellet in je 500 µl HTF Medium resuspendiert.

2.5.2 Markierung mit fluoreszierenden Lektinen

Die beiden Lektine PSA und ConA waren zur Sichtbarmachung im Fluoreszenzmikroskop mit fluoreszierendem Isocyanat (FITC) markiert.

Die Proben wurden nach Inkubation mit Höchst 33258 in zwei gleichgroße Teile geteilt und mit FITC-PSA oder FITC-ConA versetzt (Abb.1).

2.5.2.1 FITC labeled *Pisum sativum* agglutinin (FITC-PSA)

Die Markierung mit FITC-PSA wurde nach dem Versuchsprotokoll von Mendoza et al. (1992) durchgeführt.

Zur Herstellung der gebrauchsfertigen Lösung wurden 5 mg FITC-PSA (Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Deisenhofen, BRD) in 1 ml Aqua dest. gelöst. Je 10 µl der Lösung wurden in Eppendorf-Hütchen pipettiert und bei -20°C gelagert.

Vor Verwendung des FITC-PSA wurden 20 µl dieser Lösung mit PBS-Puffer so verdünnt, daß das Gemisch 50 µg FITC-PSA/ml enthielt.

Ca. 150 µl der Spermatozoensuspensionen wurden auf Objektträgern ausgestrichen, luftgetrocknet und dann 15 Minuten in 100% Methanol inkubiert. Nach der Inkubation wurden die 4 Objektträger erneut getrocknet und anschließend mit 150 µl FITC-PSA (Konzentration siehe oben) überschichtet. In einer feuchten, dunklen Kammer wurden die Objektträger 30 Minuten inkubiert und danach das überschüssige FITC-PSA mit Aqua dest. abgewaschen.

2.5.2.2 FITC labeled Concanavalin A (FITC-ConA)

Die Fluoreszenzfärbung mit FITC-ConA wurde nach dem Versuchsprotokoll von Holden et al. (1990) durchgeführt.

5 mg FITC-ConA (Sigma-Aldrich GmbH, Deisenhofen, BRD) wurden in 1 ml Aqua dest. gelöst und je 10 µl der Lösung in Eppendorf-Hütchen bei -20°C tiefgefroren.

Vor Verwendung des FITC-ConA wurden 20 µl dieser Lösung mit PBS-Puffer derart verdünnt, daß das Gemisch 50 µg FITC-ConA/ml enthielt.

Zu den Spermatozoensuspensionen wurde 10 % neutral gepuffertes Formalin gegeben. Es folgte eine Inkubation von 1-2 Stunden bei Raumtemperatur in einem lichtgeschützten Raum. Danach wurden die Proben 5 Minuten bei 1000 × g zentrifugiert; der Überstand wurde bis auf 50 µl verworfen und das Pellet in die Restlösung resuspendiert.

Ca. 150 µl der Proben wurden auf Objektträger ausgestrichen und luftgetrocknet.

Die Objektträger wurden mit ca. 150 µl FITC-ConA (Konzentration siehe oben) überschichtet und für 30 Minuten in einer feuchten, lichtgeschützten Kammer inkubiert.

Zum Abwaschen des überschüssigen FITC-ConA wurden die Objektträger mit Aqua dest. gespült.

2.6 Auszählung der markierten Spermatozoen

Nach Markierung mit den Lektinen wurde auf die Objektträger 20 µl Antioxidationsmittel pipettiert, um einen verfrühten Verlust der Fluoreszenz zu verhindern. Danach wurden die Spermatozoen unter einem Fluoreszenzmikroskop (Firma Zeiss, 100er Objektiv mit Ölimmersion – Verwendete Filter: B 2A Filter mit 450-520 nm, UV2A Filter mit 330-420 nm) ausgezählt.

2.6.1 Auszählung der mit FITC-ConA markierten Spermatozoen

Pro Objektträger wurden 200 Spermatozoen ausgezählt. Jedes Spermatozoon wurde auf „vollständig“, „teilweise“ oder „nicht vorhandene“ Fluoreszenz des Spermatozoenkopfes überprüft.

Dabei wurden nicht markierte Spermatozoen als "nicht akrosomal reagiert", fleckig oder teilweise fluoreszierende Spermatozoen als "teilweise akrosomal reagiert" und vollständig, gleichmäßig fluoreszierende Spermatozoen als "vollständig akrosomal reagiert" bezeichnet (siehe Abbildung 2a, 2b und 2c).

Außerdem wurde die Vitalität der Spermatozoen durch Färbung mit Höchst 33258 überprüft. Dabei wurden fluoreszierende Spermatozoen als tot bewertet und in der Auszählung nicht berücksichtigt.

2.6.2 Auszählung der mit FITC-PSA markierten Spermatozoen

Pro Objektträger wurden 200 Spermatozoen ausgezählt. Jedes Spermatozoon wurde auf „vollständig“, „teilweise“ oder „nicht vorhandene“ Fluoreszenz des Spermatozoenkopfes überprüft.

Dabei wurde vollständige grünliche Fluoreszenz des Akrosoms als „nicht akrosomal reagiert“, teilweise, fleckige Fluoreszenz des Akrosoms („patchy pattern“) als „teilweise akrosomal reagiert“ und keine bzw. äquatoriale Fluoreszenz des Akrosoms als „vollständig akrosomal reagiert“ gewertet (siehe Abbildung 3a, 3b und 3c).

Bei der Auswertung wurde die Vitalität der Spermatozoen durch Markierung mit Höchst 33258 überprüft. Tote Spermatozoen wurden bei der Auszählung nicht berücksichtigt.

Abb.2a: Akrosomal intaktes Spermatozoon, Markierung mit FITC-ConA

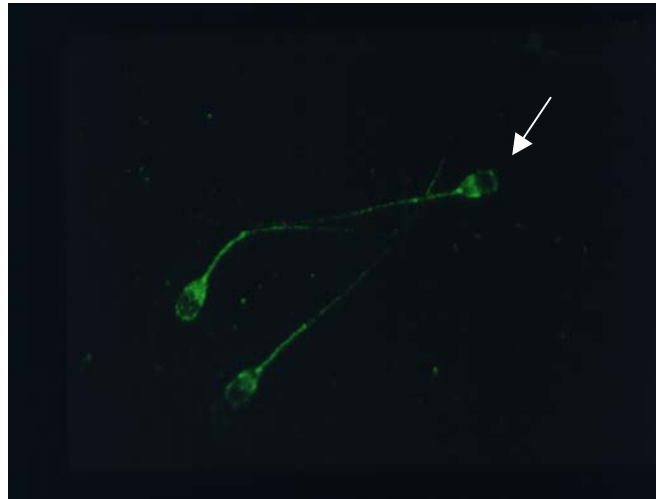


Abb.2b: Teilweise akrosomal reagiertes Spermatozoon, Markierung mit FITC-ConA

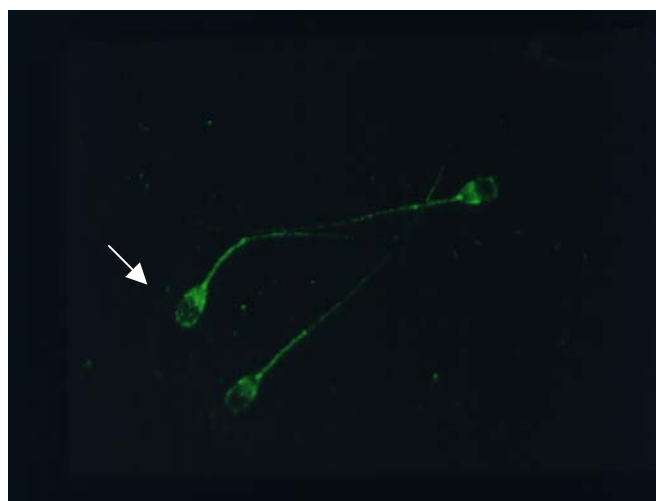


Abb.2c: Vollständig akrosomal reagiertes Spermatozoon, Markierung mit FITC-ConA

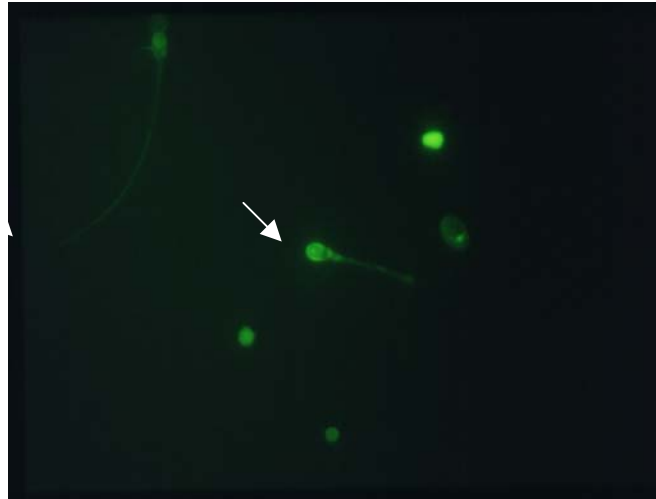


Abb3a: Akrosomal intaktes Spermatozoon, Markierung mit FITC-PSA

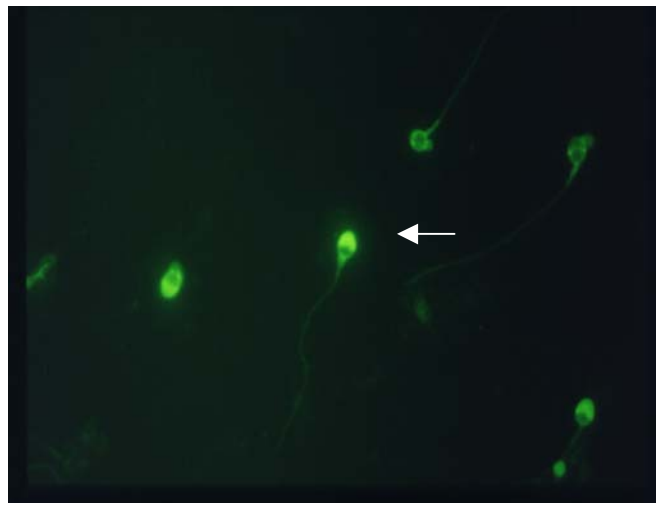


Abb3b: Teilweise akrosomal reagiertes Spermatozoon, Markierung mit FITC-PSA

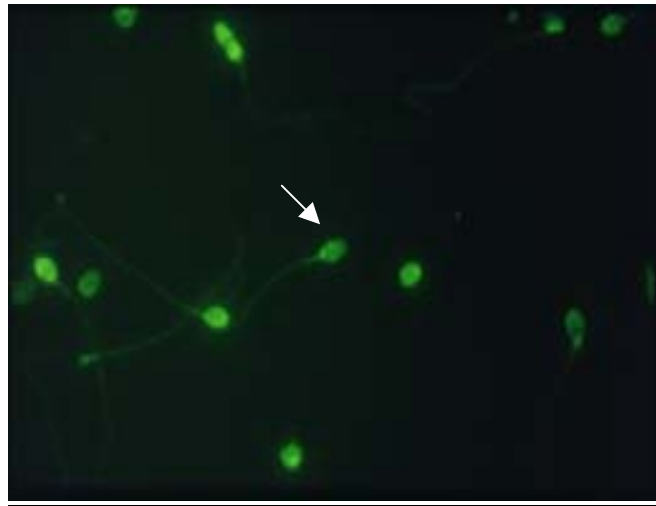
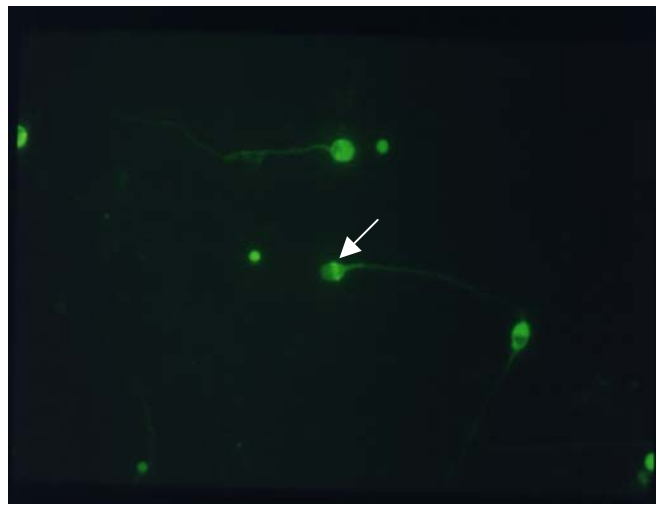


Abb3c: Vollständig akrosomal reagiertes Spermatozoon, Markierung mit FITC-PSA



2.7 Intraindividuelle Reproduzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei fertilen Spendern

Die Ejakulate der 6 fertilen Spender wurden nach dem oben beschriebenen Versuchsprotokoll behandelt und ausgezählt.

Die Spenderejakulate wurden innerhalb eines Jahres (in 2-3 monatigen Abständen) zwischen drei und sechs Mal untersucht und die Ergebnisse statistisch ausgewertet.

2.8 Vergleich der akrosomalen Reaktion mit Fertilisationsraten bei In-vitro-Fertilisation

Ejakulatproben von 31 Paaren aus dem IVF-Programm wurden nach dem in 2.2-2.6 beschriebenen Versuchsprotokoll behandelt und der Anteil akrosomal reagierter Spermatozoen bestimmt.

Dabei bestanden die untersuchten Proben aus den Überschüssen der Ejakulate, die zur In-vitro-Fertilisation benutzt wurden.

Die jeweiligen Fertilisationsraten der Eizellen der Partnerinnen, die zwischen 0-100 % lagen, wurden den Ejakulatergebnissen zugeordnet und statistisch ausgewertet.

2.9 Statistik

Die statistische Auswertung erfolgte durch Herrn Papst am Institut für medizinische Informatik der Justus-Liebig-Universität in Gießen.

Dabei wurden 2fache Varianzanalysen, Student T-Test für abhängige Stichproben und der Spearman Korrelationskoeffizient verwendet.

Die Daten wurden im Rahmen der deskriptiven Statistik als Mittelwerte \pm Standardabweichungen (Median, Spannweite) angegeben.

3. Ergebnisse

3.1 Vergleich zwischen FITC-PSA und FITC-ConA

Die Spermatozoen wurden nach dem in Abschnitt "Material und Methoden" beschriebenen Versuchsprotokoll aufbereitet. Insgesamt wurden 96 Ejakulatproben untersucht.

Tabelle 2 zeigt die ermittelten Ejakulatwerte vor und nach Glaswollfiltration.

Tab.2: Ejakulatparameter der untersuchten Proben vor und nach Glaswollfiltration (Mittelwert \pm Standardabweichung; Median, Spannweite, n=96)

	Nativejakulat	Ejakulat nach Glaswollfiltration
Spermatozoenkonzentration ($\times 10^6$ /ml)	116,5 \pm 94,2 (88,9; 8-317,6)	23,0 \pm 20,1 (18,8; 3,2-100,0)
Globalmotilität %	56,0 \pm 11,8 (55,0; 3-88)	81,0 \pm 6,1 (82,0; 61-92)
a Motilität % ¹	34,6 \pm 13,9 (32,5; 8-62)	56,5 \pm 10,5 (59,0; 20-70)
b Motilität % ¹	14,9 \pm 5,6 (15,0; 5-35)	17,1 \pm 5,4 (16,0; 9-35)
c Motilität % ¹	6,8 \pm 3,4 (5,0; 1-20)	7,3 \pm 4,1 (7,0; 1-21)

¹ Anmerkung: Die Globalmotilität wird nach WHO-Kriterien in a- „schnell und linear progressiv bewegliche Spermatozoen“, b- „langsam, träge linear bewegliche oder nicht linear progressiv bewegliche Spermatozoen“ und c- „nicht progressiv bewegliche Spermatozoen“ eingeteilt.

Die Spermatozoenkonzentration wurde nach Glaswollfiltration auf $5 \times 10^6/\text{ml}$ eingestellt.

Nach dreistündiger Kapazitation der Ejakulate wurde die akrosomale Reaktion durch Ionophor A23187 bzw. dbcAMP ausgelöst.

Die Differenzierung der akrosomal reagierten Spermatozoen erfolgte nach Markierung mit FITC-PSA oder FITC-ConA gemäß der in Abschnitt 2.6. beschriebenen Kriterien.

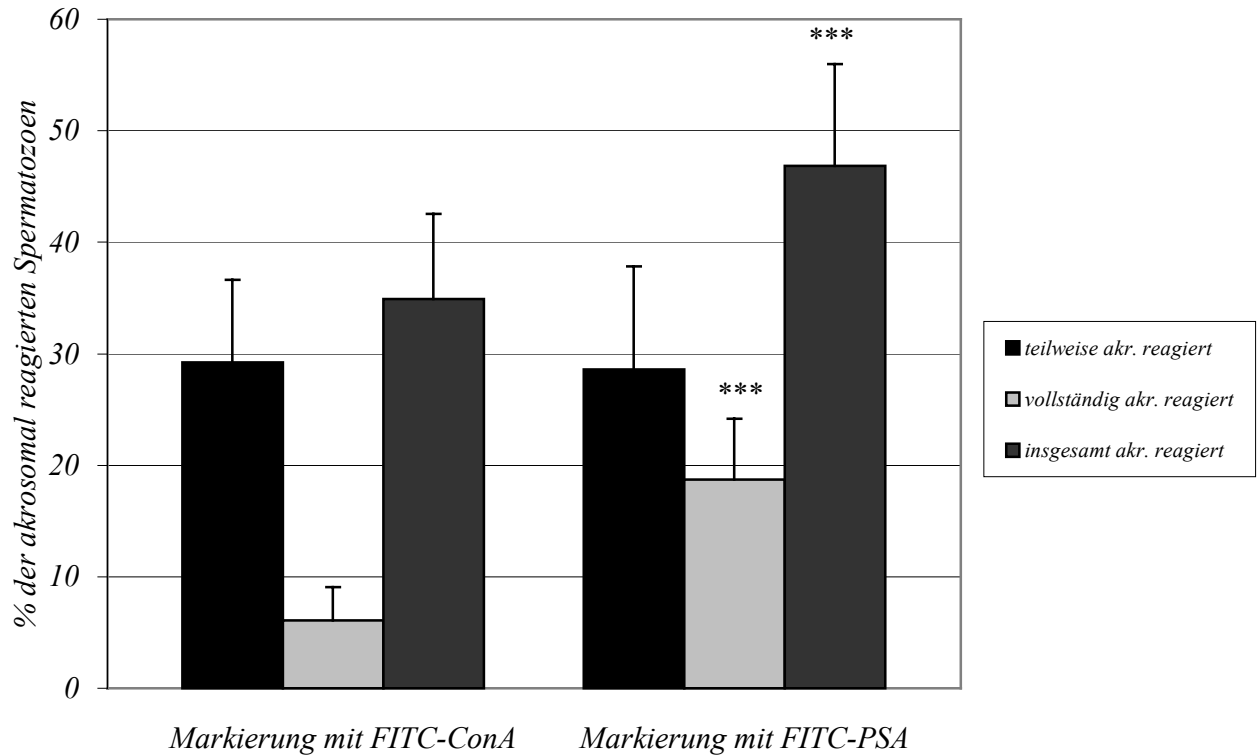
3.1.1 Vergleich der Ergebnisse von FITC-PSA und FITC-ConA nach Induktion der akrosomalen Reaktion mit Ionophor A23187

Die Proben wurden eine Stunde mit Ionophor A23187 inkubiert. Tote Spermatozoen wurden bei der Auszählung nicht berücksichtigt.

Die Abbildungen 4 und 5 zeigen die Rate spontan akrosomal reagierter Spermatozoen sowie nach Induktion mit Calcium Ionophor A23187 akrosomal reagierten Spermatozoen getrennt nach beiden Nachweismethoden.

Dabei werden die Spermatozoen unterteilt in „teilweise“, „vollständig“ und „insgesamt“ akrosomal reagiert.

Abb.4: Vergleich verschiedener Stadien der akrosomalen Reaktion nach Induktion mit Ionophor A23187 und Markierung mit FITC-PSA bzw. FITC-ConA (n=96)



Die Werte wurden nach Markierung mit FITC-ConA bzw. FITC-PSA einzeln für die Gruppen „teilweise akrosomal reagiert“, „vollständig akrosomal reagiert“ und „insgesamt akrosomal reagiert“ miteinander verglichen.

Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

Statistische Methode: Varianzanalyse

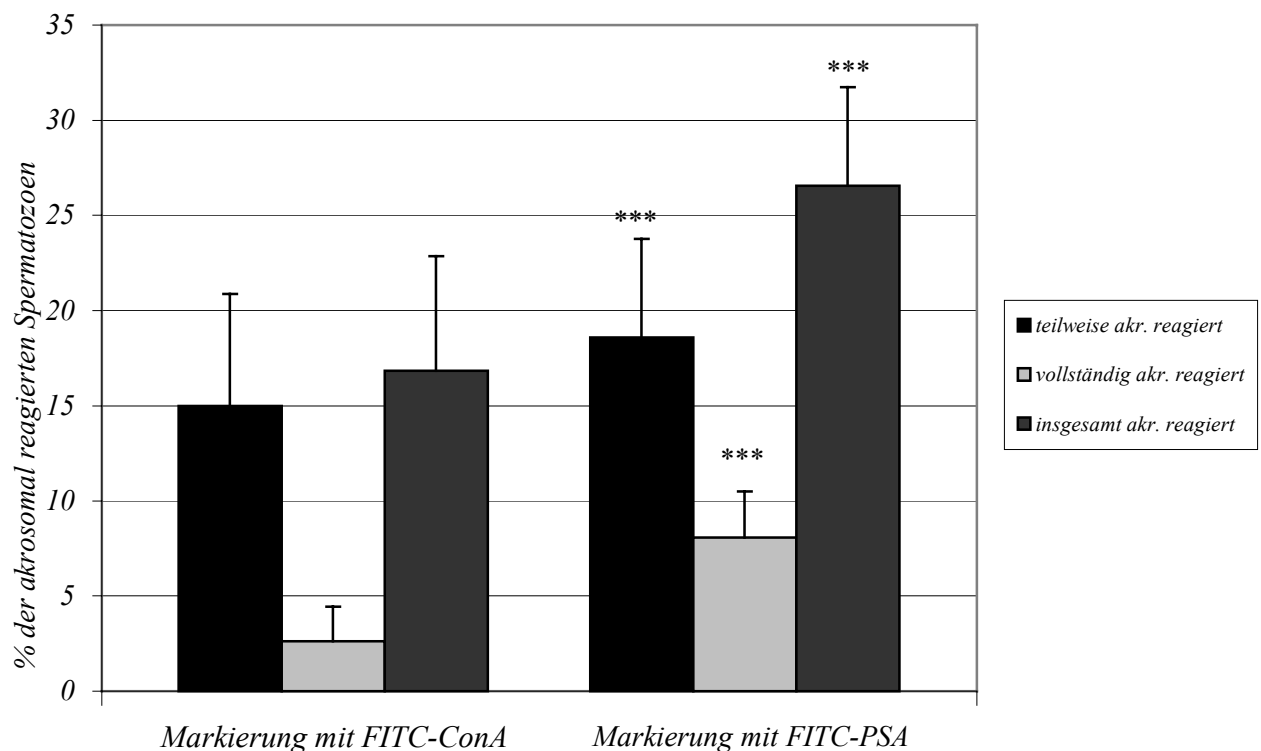
*** $p < 0,001$ verglichen mit entsprechenden Werten bei Markierung mit FITC-ConA

Vergleicht man die Ergebnisse der beiden Markierungen miteinander, so zeigen sich signifikant höhere Werte des Anteils „insgesamt akrosomal reagierter Spermatozoen“ bei Markierung der Proben mit FITC-PSA gegenüber der mit FITC-ConA.

Dabei fällt auf, daß die Zahl der „teilweise akrosomal reagierten Spermatozoen“ bei beiden Markierungen sehr ähnlich ist, aber die Anzahl der „vollständig akrosomal reagierten Spermatozoen“ bei FITC-PSA Markierung signifikant höher liegt als bei Markierung mit FITC-ConA. Dies gilt für mit Ionophor A23187 induzierte akrosomal reagierte Spermatozoen.

Bei nicht induzierten Spermatozoen (Kontrolle mit DMSO) findet man dagegen auch bei den „teilweise akrosomal reagierten Spermatozoen“ eine höhere Anzahl an mit FITC-PSA markierten Spermatozoen im Vergleich zu FITC-ConA markierten Spermatozoen (Abb. 5).

Abb.5: Vergleich verschiedener Stadien der akrosomalen Reaktion in den Kontrollproben (DMSO), Markierung mit FITC-PSA und FITC-ConA (n=96)



Die Proben wurden mit FITC-ConA bzw. FITC-PSA markiert und die erhaltenen Werte einzeln für die Gruppen „teilweise akrosomal reagiert“, „vollständig akrosomal reagiert“ und „insgesamt akrosomal reagiert“ miteinander verglichen.

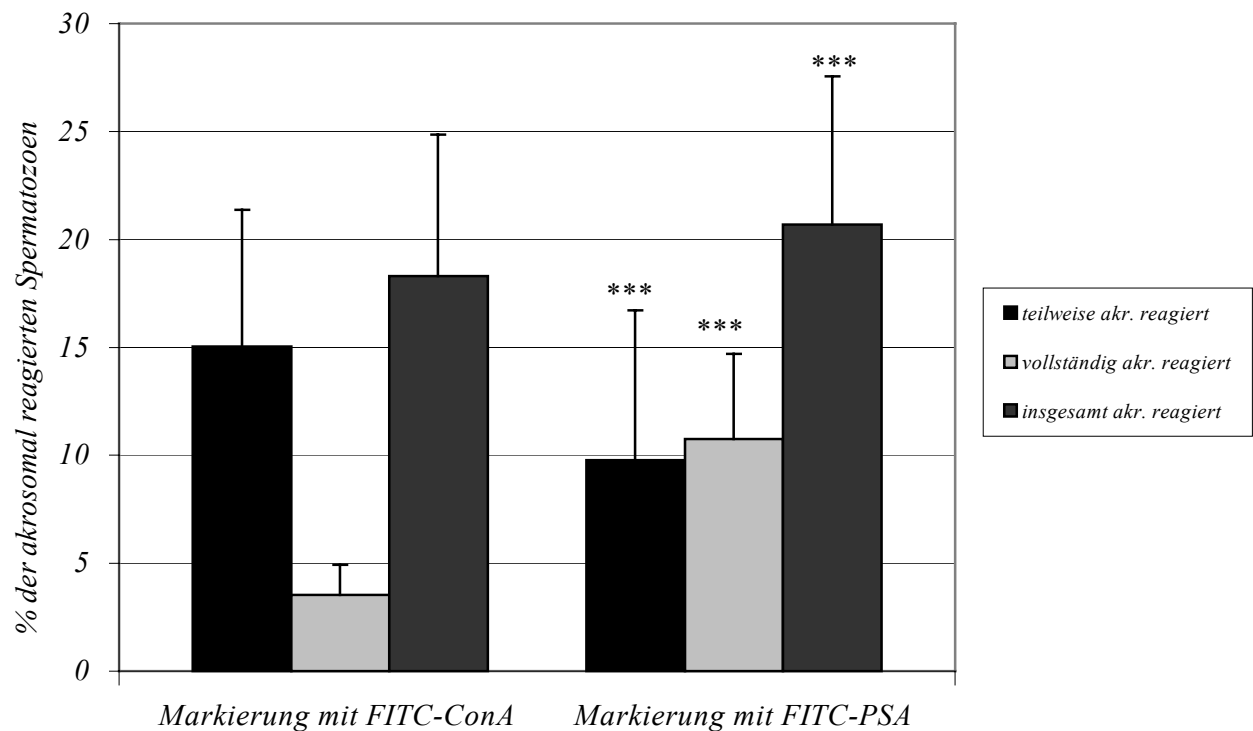
Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

Statistische Methode: Varianzanalyse

*** $p < 0,001$ verglichen mit den entsprechenden Werten bei FITC-ConA Markierung.

Die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion (Δ AR) wurde ermittelt durch Subtraktion des Anteils spontan akrosomal reagierter Spermatozoen vom Prozentsatz der akrosomal reagierten Spermatozoen nach Induktion mit Ionophor A23187 (Abb. 6).

Abb.6: Δ AR -Werte akrosomal reagierte Spermatozoen, Induktion mit Ionophor A23187, Markierung mit FITC-PSA und FITC-ConA, (n=96)



Die Werte wurden nach Markierung mit FITC-ConA bzw. FITC-PSA einzeln für die Gruppen „teilweise akrosomal reagiert“, „vollständig akrosomal reagiert“ und „insgesamt akrosomal reagiert“ miteinander verglichen.

Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

Statistische Methode: Varianzanalyse

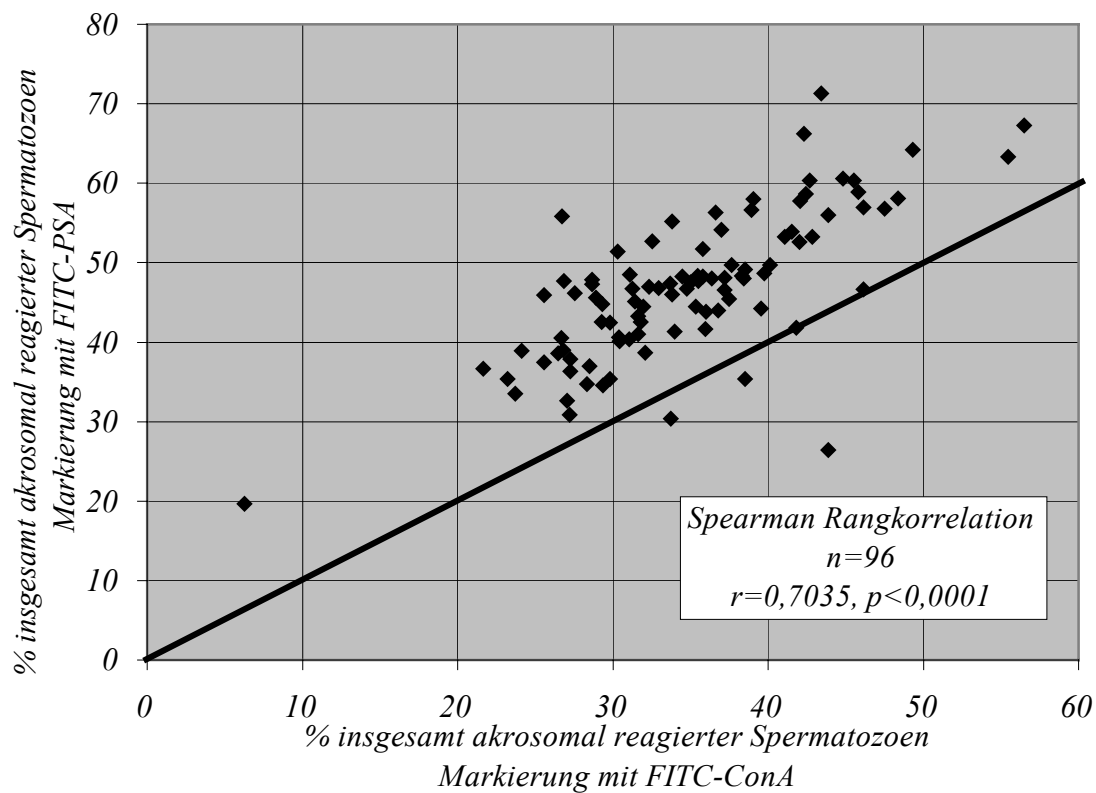
*** $p < 0,001$ verglichen mit den entsprechenden Werten bei Markierung mit FITC-ConA.

Hierbei zeigt sich, daß die Δ AR-Werte der „teilweise akrosomal reagierten Spermatozoen“ bei der Markierung mit FITC-ConA deutlich höher sind als die vergleichbaren Werte bei Markierung mit FITC-PSA.

Dagegen liegt die Anzahl „vollständig“ und „insgesamt akrosomal reagierter Spermatozoen“ bei Markierung mit FITC-PSA wieder signifikant über der mit FITC-ConA.

Trotz der unterschiedlichen absoluten Werte korrelieren die Ergebnisse bei Markierung mit FITC-ConA bzw. FITC-PSA gut und positiv miteinander (Abb.7).

Abb.7: Korrelation des Anteils insgesamt akrosomal reagierter Spermatozoen nach Induktion mit Ionophor A23187, Markierung mit FITC-ConA und FITC-PSA



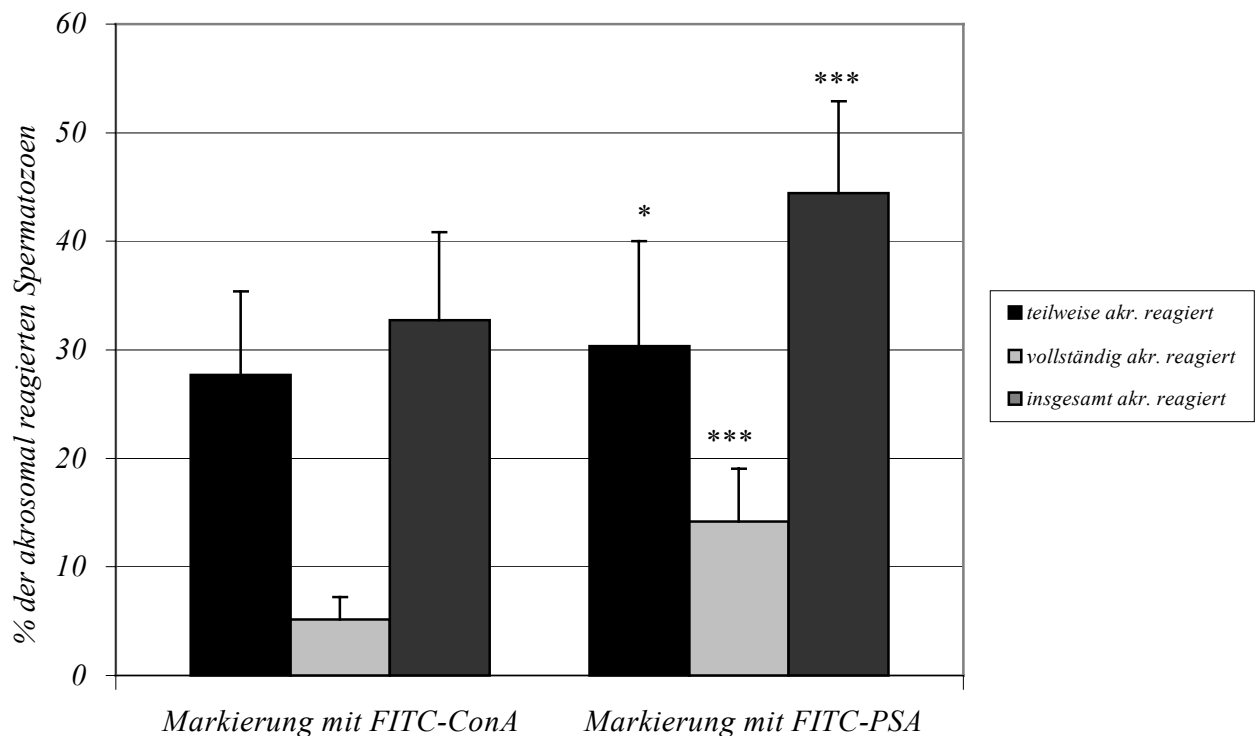
Die Linie zeigt die hypothetische Meßpunktlage an, wenn die Meßwerte beider Markierungen völlig übereinstimmen würden.

3.1.2 Vergleich der Ergebnisse von FITC-PSA und FITC-ConA nach Induktion der akrosomalen Reaktion mit dbcAMP

Die Proben wurden eine Stunde mit dbcAMP inkubiert. Tote Spermatozoen wurden bei der Auswertung nicht berücksichtigt.

Die Rate an spontan bzw. nach Induktion mit dbcAMP akrosomal reagierten Spermatozoen werden in Abbildung 8 und 9 getrennt nach beiden Nachweismethoden dargestellt. Dabei werden die Spermatozoen in „teilweise“, „vollständig“ und „insgesamt akrosomal reagiert“ unterteilt.

Abb.8: Vergleich verschiedener Stadien der akrosomalen Reaktion nach Induktion mit dbcAMP und Markierung mit FITC-PSA und FITC-ConA (n=96)



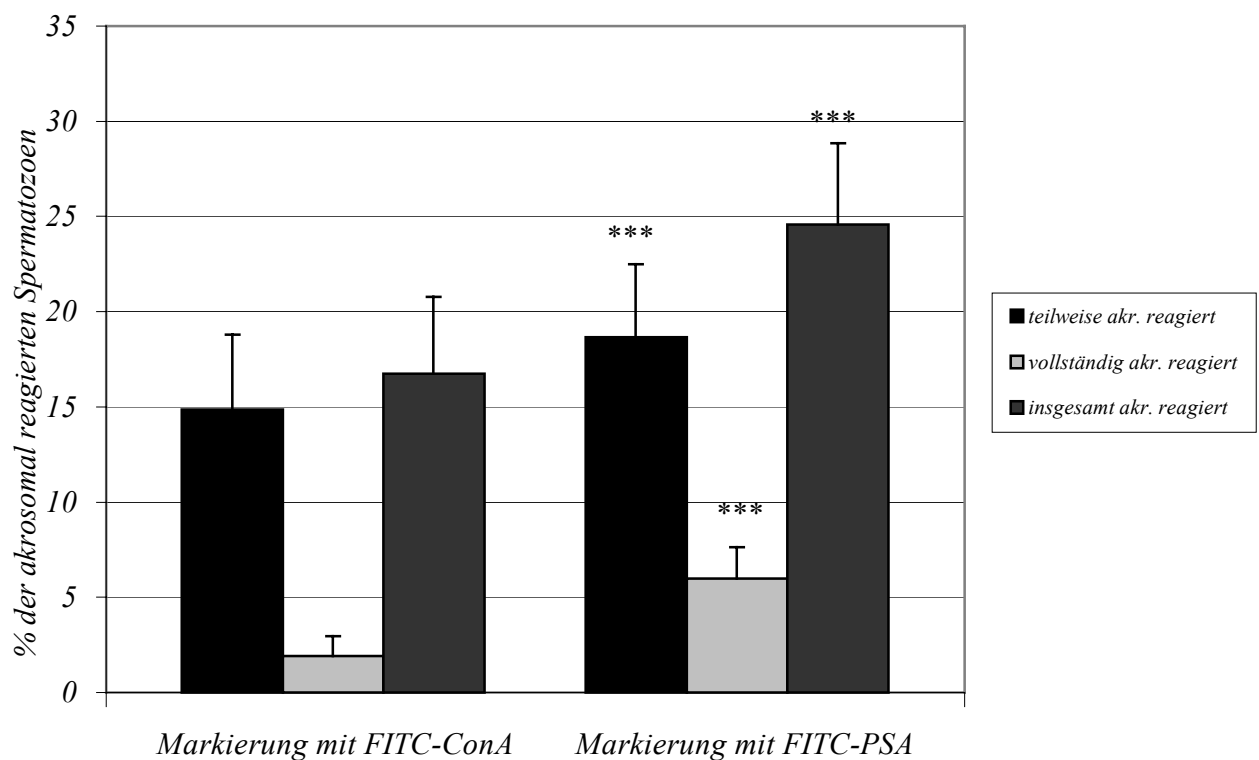
Die Proben wurden nach Markierung mit FITC-ConA bzw. FITC-PSA einzeln für die Gruppen „teilweise akrosomal reagiert“, „vollständig akrosomal reagiert“ und „insgesamt akrosomal reagiert“ miteinander verglichen. Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Statistische Methode: Varianzanalyse

* $p < 0,05$, *** $p < 0,001$ verglichen mit Werten bei Markierung mit FITC-ConA.

Auch hier finden sich beim Vergleich der Ergebnisse beider Markierungen miteinander signifikant höhere Werte des Anteils „insgesamt akrosomal reagierter Spermatozoen“ bei Markierung der Proben mit FITC-PSA als bei FITC-ConA.

Die Mittelwerte der „teilweise akrosomal reagierten Spermatozoen“ bei beiden Markierungen sind dabei ähnlich, dennoch war aufgrund der großen Stichprobe ein signifikanter Unterschied feststellbar. Die Anzahl der „vollständig akrosomal reagierten Spermatozoen“ bei FITC-PSA Markierung liegt signifikant höher als bei Markierung mit FITC-ConA (Abb.8).

Abb.9: Vergleich verschiedener Stadien der akrosomalen Reaktion in den Kontrollgruppen (ohne Induktion), Markierung mit FITC-PSA bzw. FITC-ConA (n=96)



Die Proben wurden mit FITC-ConA bzw. FITC-PSA markiert und die Werte einzeln für die Gruppen „teilweise akrosomal reagiert“, „vollständig akrosomal reagiert“ und „insgesamt akrosomal reagiert“ miteinander verglichen.

Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

Statistische Methode: Varianzanalyse

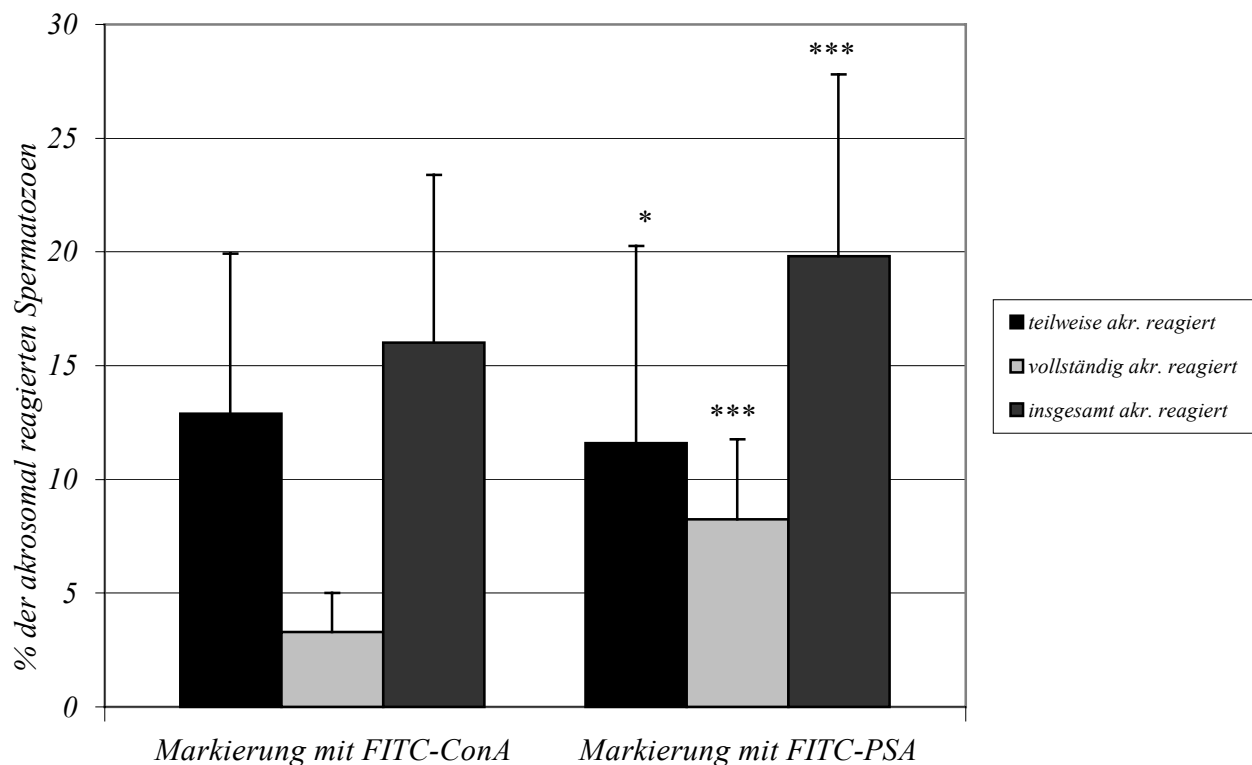
*** $p < 0,001$ verglichen mit den entsprechenden Werten bei Markierung mit FITC-ConA.

In der Kontrollgruppe zeigt sich auch bei den „teilweise akrosomal reagierten Spermatozoen“ eine höhere Anzahl an mit FITC-PSA markierten Spermatozoen im Vergleich zu FITC-ConA markierten Spermatozoen (Abb. 9).

Beim Vergleich der Δ AR-Werte findet man eine leicht höhere Anzahl an „teilweise akrosomal reagierten Spermatozoen“ nach Markierung mit FITC-ConA als nach FITC-PSA Markierung (Abb.10).

Dagegen liegt die Anzahl „vollständig“ und damit auch „insgesamt akrosomal reagierten Spermatozoen“ bei Markierung mit FITC-PSA wieder signifikant über der mit FITC-ConA.

Abb.10: Δ AR-Werte akrosomal reagierter Spermatozoen, Induktion mit dbcAMP, (n=96)

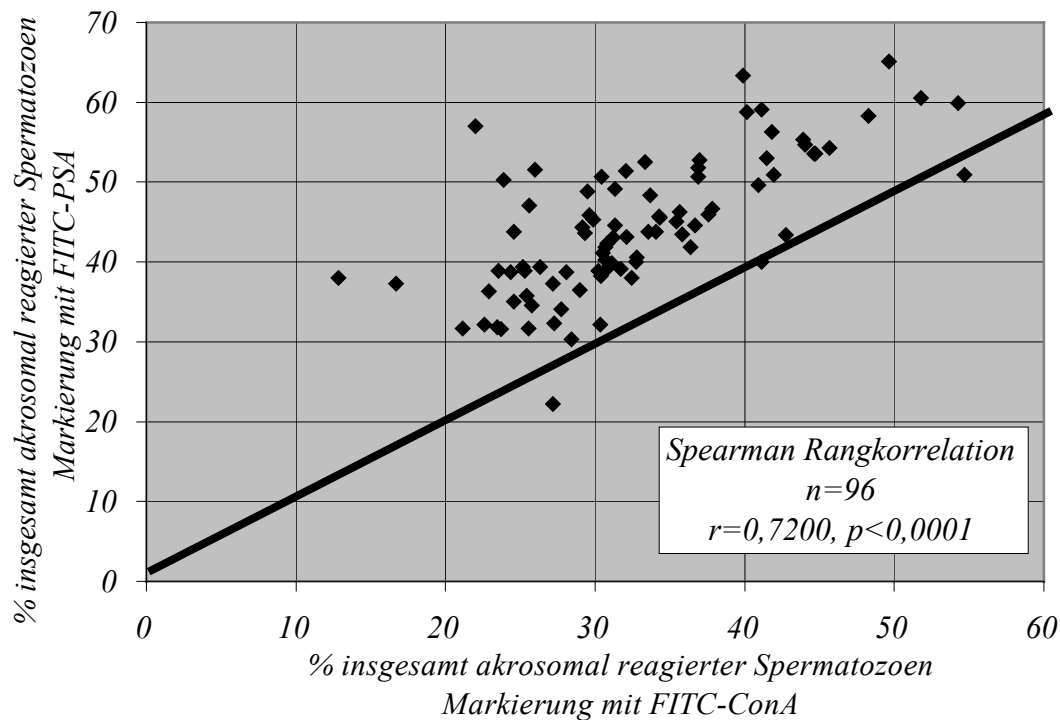


Nach Markierung der Proben mit FITC-ConA bzw. FITC-PSA wurden die Werte einzeln für die Gruppen „teilweise akrosomal reagiert“, „vollständig akrosomal reagiert“ und „insgesamt akrosomal reagiert“ miteinander verglichen. Es werden die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben. Statistische Methode: Varianzanalyse

* $p < 0,05$; *** $p < 0,001$ verglichen mit den Werten bei Markierung mit FITC-ConA

Auch bei Induktion der akrosomalen Reaktion mit dbcAMP zeigt sich eine gute Korrelation bei Vergleich der beiden Markierungsmethoden, obwohl die absoluten Werte sich von einander unterscheiden (Abb.11).

Abb.11: Korrelation des Anteils insgesamt akrosomal reagierter Spermatozoen nach Induktion mit dbcAMP, Markierung mit FITC-ConA und FITC-PSA



Die Linie zeigt die hypothetische Meßpunktlage an, wenn die Meßwerte beider Markierungen völlig übereinstimmen würden.

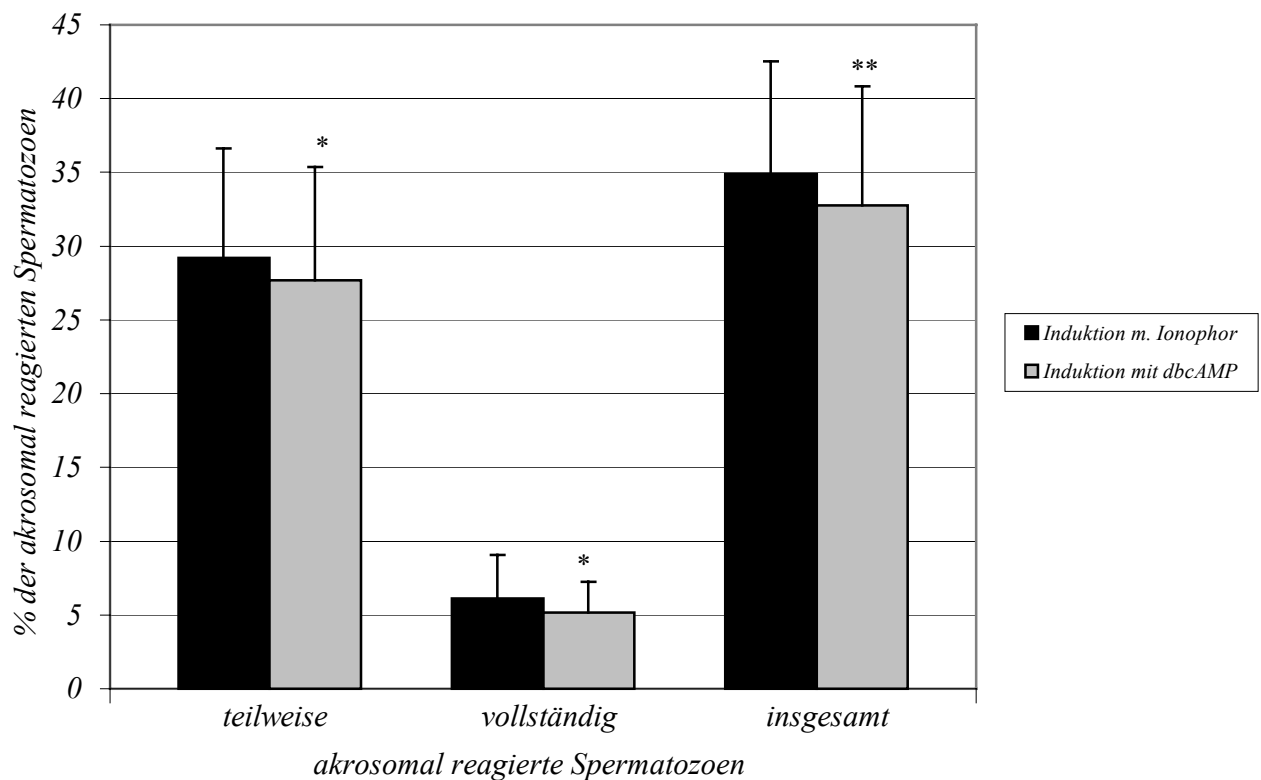
3.1.3 Vergleich der Induktion der akrosomalen Reaktion mit Ionophor A23187 bzw. dbcAMP

In den vorhergehenden 2 Kapiteln wurde untersucht, ob nach Markierung mit FITC-PSA bzw. FITC-ConA unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Anteils an „teilweise“ oder „vollständig akrosomal reagierten Spermatozoen“ erzielt wurden.

Darüber hinaus wurde auch verglichen, ob sich die Rate akrosomal reagierter Spermatozoen zwischen den beiden Stimulationsprotokollen unterschied.

Hierzu wurden die Ergebnisse, getrennt für beide Nachweismethoden, erneut statistisch ausgewertet.

Abb.12: Vergleich der Induktion der akrosomalen Reaktion durch dbcAMP bzw. Ionophor, Markierung mit FITC-ConA (n=96)



Nach Auslösung der akrosomalen Reaktion mit Ionophor A23187 bzw. dbcAMP wurden die Proben mit FITC-ConA markiert. Die Auswertung der Werte erfolgte getrennt für die Gruppen „teilweise akrosomal reagiert“, „vollständig akrosomal reagiert“ und „insgesamt akrosomal reagiert“.

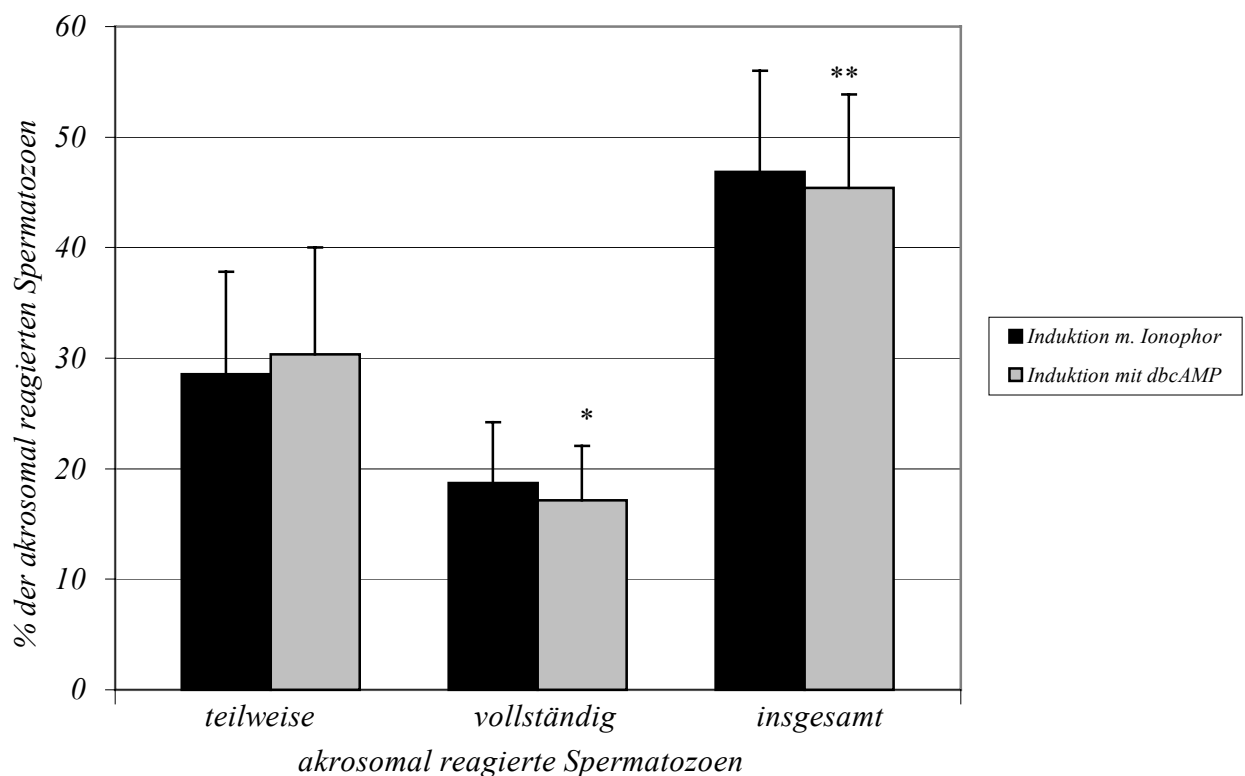
Es werden die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

Statistische Methode: Varianzanalyse

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den entsprechenden Werten bei Induktion mit Ionophor A23187.

Dabei zeigen sich bei den ermittelten Mittelwerten ähnliche Induktionsraten der akrosomalen Reaktion bei Zugabe von Ionophor A23187 bzw. dbcAMP. Aufgrund des großen Stichprobenumfanges ergeben sich allerdings teilweise signifikante Unterschiede in der Statistik. Dies gilt sowohl bei Markierung der Spermatozoen mit FITC-PSA wie auch bei Markierung mit FITC-ConA (Abb.12 und 13).

Abb.13: Vergleich der Induktion der akrosomalen Reaktion durch dbcAMP bzw. Ionophor, Markierung mit FITC-PSA (n=96)



Nach Auslösung der akrosomalen Reaktion mit Ionophor A23187 bzw. dbcAMP und Markierung der Proben mit FITC-PSA wurden die Werte einzeln für die Gruppen „teilweise akrosomal reagiert“, „vollständig akrosomal reagiert“ und „insgesamt akrosomal reagiert“ miteinander verglichen.

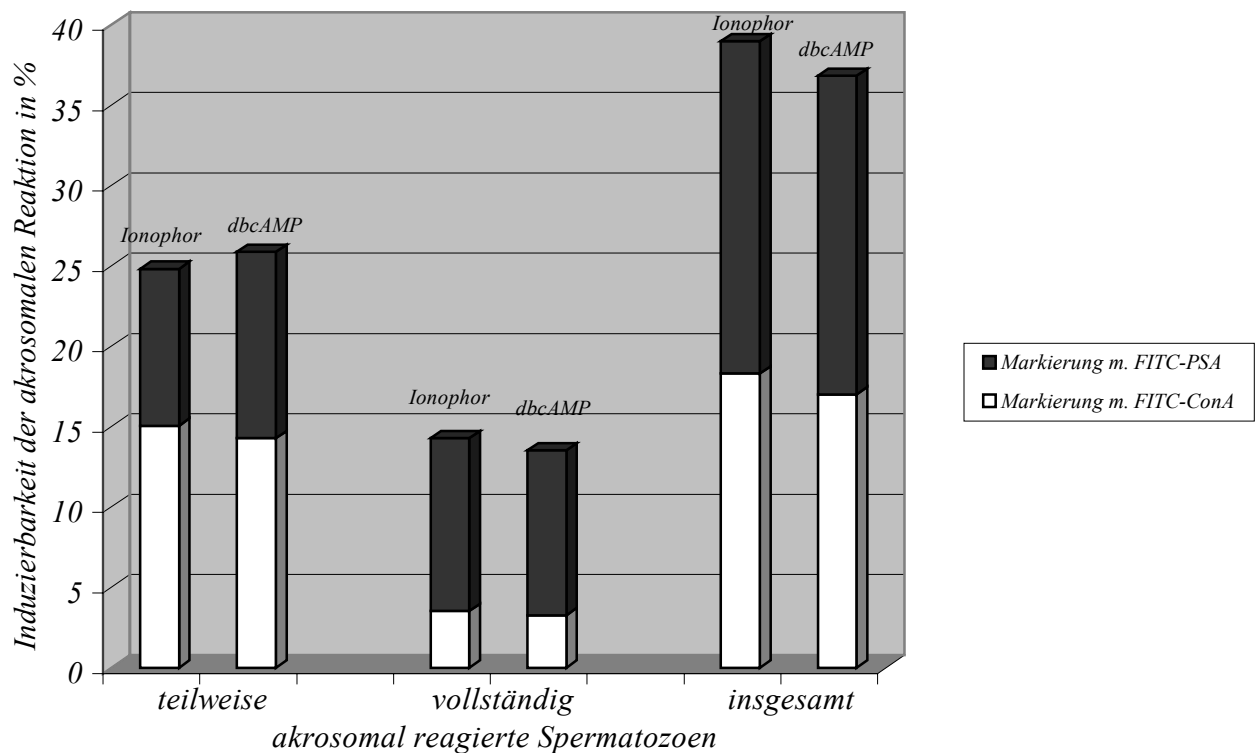
Es werden Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

Statistische Methode: Varianzanalyse

* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$ verglichen mit den entsprechenden Werten bei Induktion mit Ionophor A23187.

Aus den Ergebnissen wurde der Δ AR-Werte der akrosomal reagierten Spermatozoen berechnet (Abb. 14).

Abb.14: Vergleich der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion durch Ionophor A23187 bzw. dbcAMP, Markierung mit FITC-ConA und FITC-PSA (n=96)



Die Proben wurden mit Ionophor A23187 bzw. dbcAMP induziert und mit FITC-ConA bzw. FITC-PSA markiert. Die Werte wurden einzeln für die Gruppen „teilweise akrosomal reagiert“, „vollständig akrosomal reagiert“ und „insgesamt akrosomal reagiert“ bestimmt und miteinander verglichen.

Es werden Mittelwerte angegeben. Die Werte unterscheiden sich nicht signifikant.

Methode: Varianzanalyse

Auch beim Vergleich der Δ AR-Werte stimmen die Ergebnisse bei Induktion mit Ionophor A23187 bzw. dbcAMP überein. Es gibt keinen signifikanten Unterschied bezüglich der Induktion der akrosomalen Reaktion bei beiden Stimulationsmethoden.

3.2 Intraindividuelle Reproduzierbarkeit der akrosomalen Reaktion

Über einen Zeitraum von einem Jahr wurden Ejakulate von fertilen Spendern in 2-3 monatigen Abständen untersucht, wobei 1 Spender sechsmal, 4 Spender fünfmal und 3 Spender dreimal überprüft wurden (n=8).

Dabei ergeben sich folgende Ejakulatparameter:

Tab.3: Ejakulatparameter vor und nach Glaswollfiltration (Mittelwert \pm Standardabweichung; Median, Spannweite, n=35)

	Nativejakulat	Ejakulatwerte nach Glaswollfiltration
Spermatozoenkonzentration ($\times 10^6/\text{ml}$)	144,0 \pm 129,7 (106,6; 27-683,2)	23,6 \pm 17,7 (22,2; 3,2-78,8)
Globalmotilität %	54,6 \pm 10,1 (55,0; 37-75)	81,8 \pm 4,5 (82,0; 74-91)
a Motilität % ¹	34,6 \pm 12,9 (32,5; 8-60)	60,4 \pm 5,8 (60,5; 49-69)
b Motilität % ¹	13,9 \pm 5,9 (12,0; 6-30)	14,7 \pm 3,2 (15,0; 10-21)
c Motilität % ¹	6,9 \pm 3,6 (5,0; 2-15)	6,7 \pm 2,6 (7,0; 2-11)

¹ Anmerkung: Die Globalmotilität wird nach WHO-Kriterien in a- „schnell und linear progressiv bewegliche Spermatozoen“, b- „langsam, träge linear bewegliche oder nicht linear progressiv bewegliche Spermatozoen“ und c- „nicht progressiv bewegliche Spermatozoen“ eingeteilt.

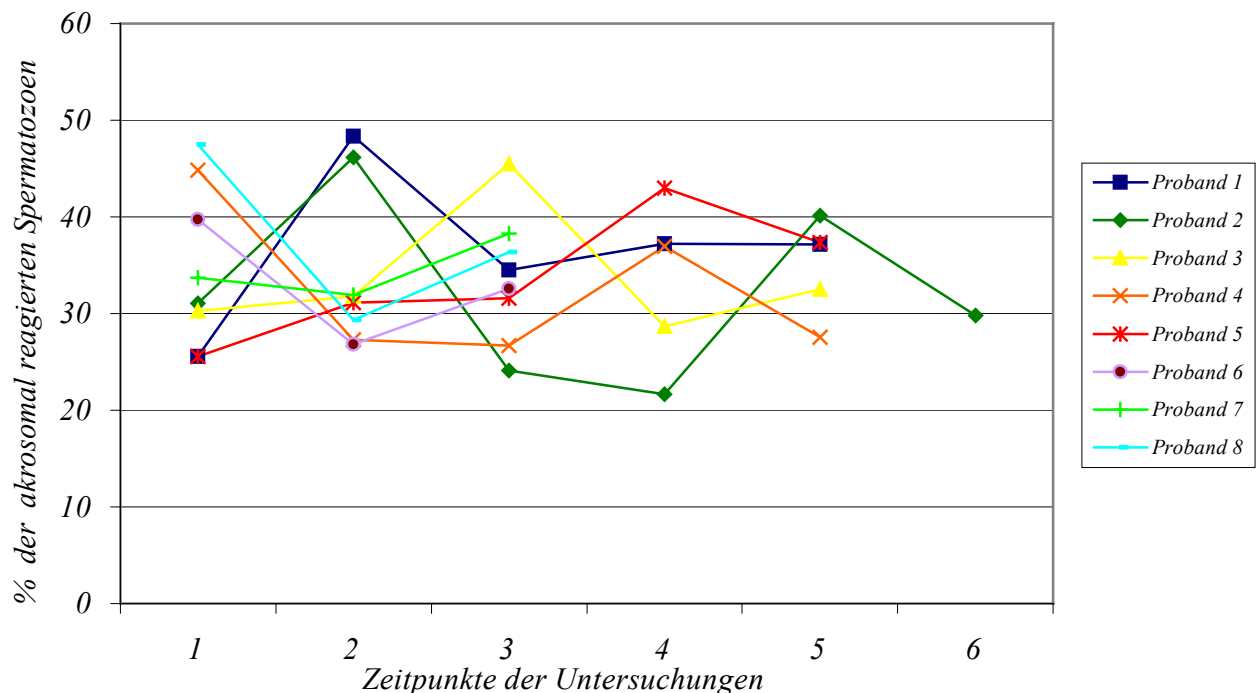
Die gewaschenen Ejakulate wurden drei Stunden bei 37°C kapazitiert und die akrosomale Reaktion mit Ionophor A23187 ausgelöst.

Zur Bestimmung der akrosomalen Reaktion wurden die Proben mit FITC-PSA bzw. FITC-ConA markiert.

Es wurden 200 Spermatozoen pro Objektträger ausgezählt, wobei nur lebende Spermatozoen berücksichtigt wurden. Die Spermatozoen wurden, gemäß ihrer Fluoreszenz, in „nicht“, „teilweise“ oder „vollständig akrosomal reagiert“ eingeteilt.

Vergleicht man die zu verschiedenen Zeitpunkten bestimmten Ergebnisse der einzelnen Probanden, so fallen Schwankungen bei der Anzahl an induzierten wie auch spontan akrosomal reagierten Spermatozoen auf. Auch die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion unterliegt diesen Schwankungen.

Abb.15: Intraindividuelle Schwankungen der akrosomalen Reaktion bei fertilen Probanden (insgesamt akrosomal reagierte Spermatozoen); Induktion mit Ionophor A23187, Markierung mit FITC-ConA, n=8



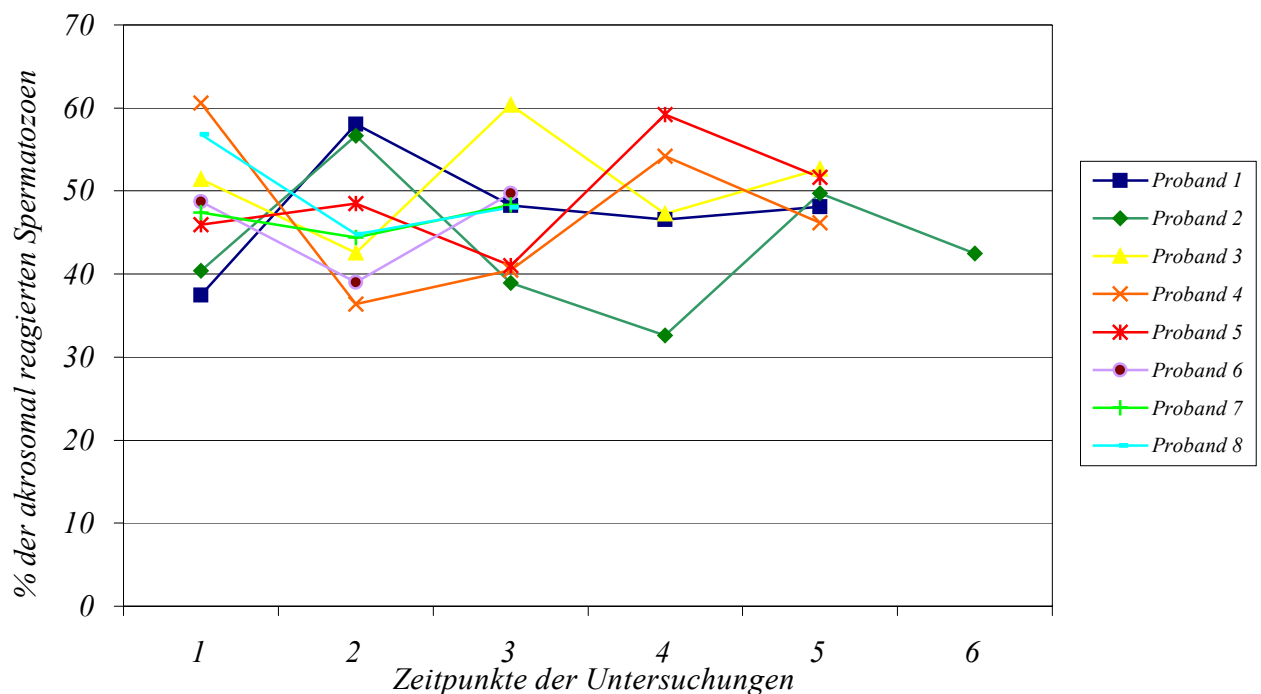
Die Proben wurden mit FITC-ConA markiert die erhaltenen Werte statistisch ausgewertet.

Es werden Werte der „insgesamt akrosomal reagierten Spermatozoen“ der einzelnen Probanden zu unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten in Beziehung gesetzt.

Dabei betragen die Schwankungsbreiten der einzelnen Probanden bei den „insgesamt akrosomal reagierten Spermatozoen“ (Induktion mit Ionophor A23187) minimal 5 und maximal 25 Prozentpunkte.

Dies gilt sowohl für Markierung der Spermatozoen mit FITC-ConA als auch FITC-PSA (Abb.15 und 16).

Abb.16: Intraindividuelle Schwankungen der akrosomalen Reaktion bei fertilen Probanden (insgesamt akrosomal reagierte Spermatozoen); Induktion mit Ionophor A23187, Markierung mit FITC-PSA, n=8



Die Proben wurden mit FITC-PSA markiert die erhaltenen Werte statistisch ausgewertet.

Es werden Werte der „insgesamt akrosomal reagierten Spermatozoen“ der einzelnen Probanden zu unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten in Beziehung gesetzt.

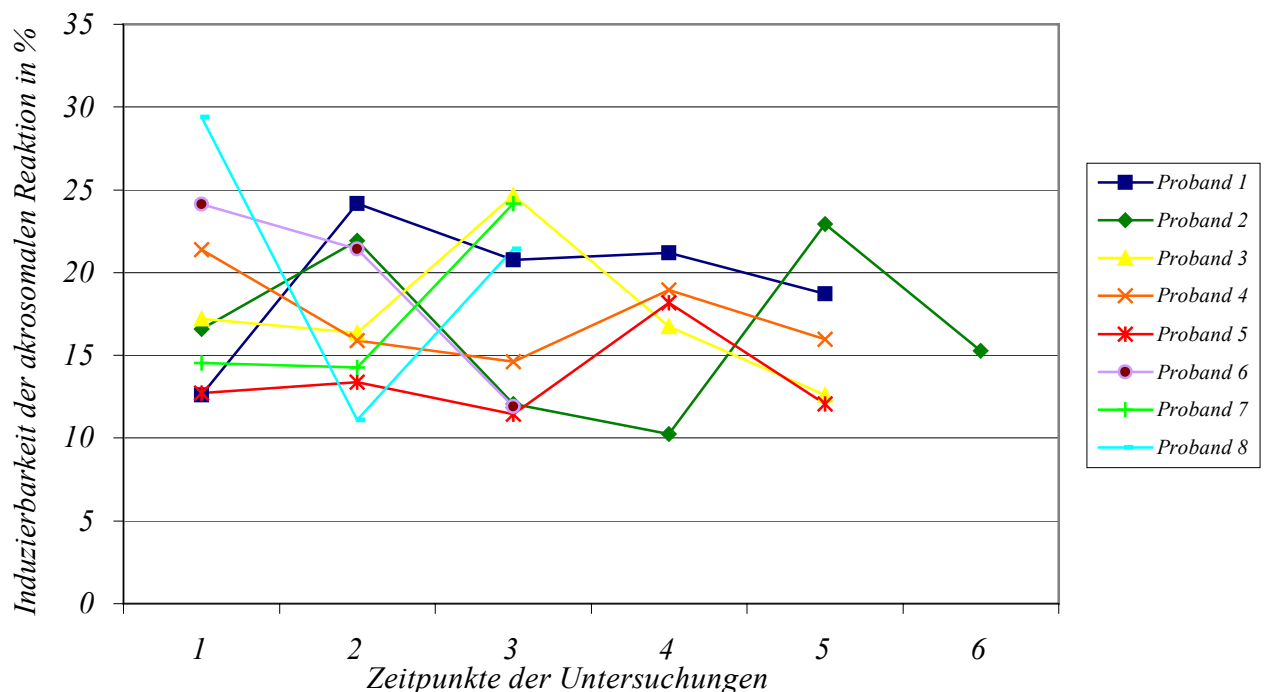
Bei den spontan „insgesamt akrosomal reagierten Spermatozoen“ liegen die Schwankungsbreiten bei den einzelnen Probanden sehr ähnlich.

Die Schwankungsbreite beträgt hier zwischen 5 und 24 Prozentpunkten (dies gilt für beide Markierungen).

Errechnet man die Schwankungsbreite für die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion liegen die Werte bei den einzelnen Probanden zwischen 6 und 18 Prozentpunkten.

Dieses Ergebnis gilt sowohl für Markierung der Spermatozoen mit FITC-ConA als auch für FITC-PSA Markierung (Abb.17 und 18).

Abb.17: Intraidividuelle Schwankungen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei fertilen Probanden, Induktion mit Ionophor A23187 und Markierung mit FITC-ConA (n=8)

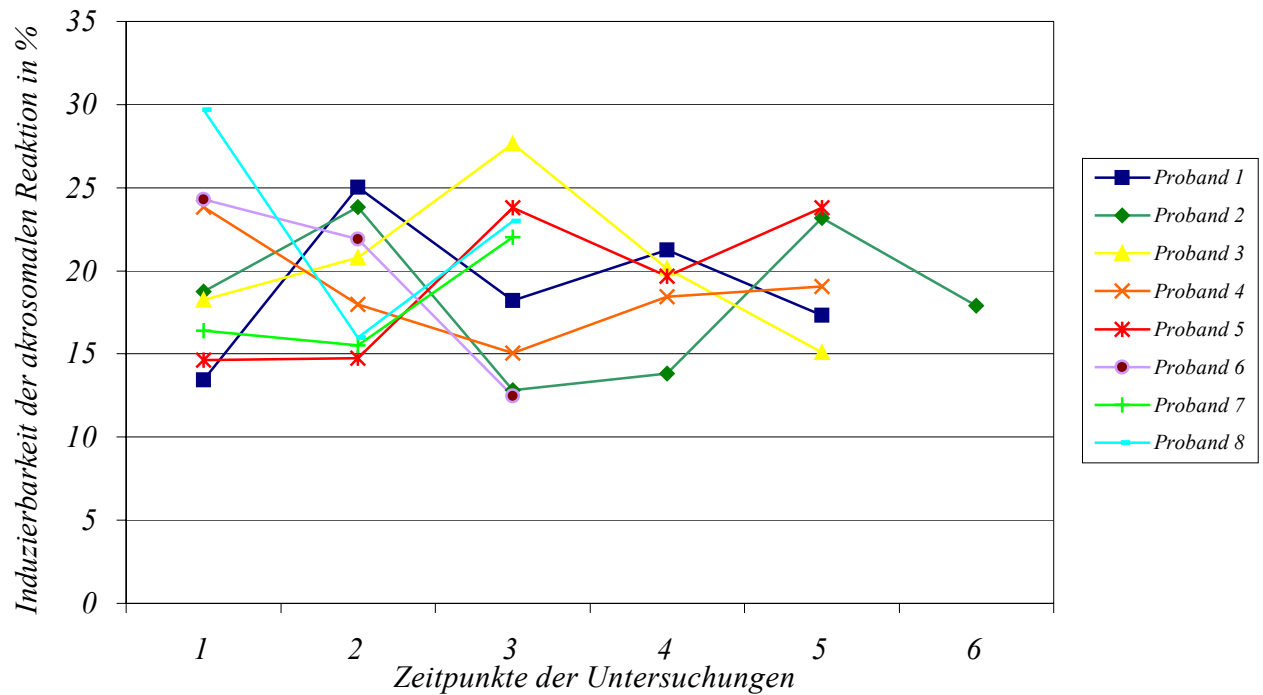


Die Proben wurden mit FITC-ConA markiert die erhaltenen Werte statistisch ausgewertet.

Es werden die ΔAR -Werte der einzelnen Probanden zu unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten in Beziehung gesetzt.

Dabei liegt die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei allen Probanden trotz der Schwankungen während der verschiedenen Messungen zu allen Zeitpunkten über 10%. Dieser Mindestwert wird als „cut-off“-Wert von Cummins et al. (1991) und Yovich et al. (1994) empfohlen.

Abb.18: Intraindividuelle Schwankungen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei fertilen Probanden, Induktion mit Ionophor A23187 und Markierung mit FITC-PSA (n=8)



Die Proben wurden mit FITC-PSA markiert die erhaltenen Werte statistisch ausgewertet.

In der Abbildung werden die Δ AR-Werte der einzelnen Probanden zu unterschiedlichen Beobachtungszeitpunkten in Beziehung gesetzt.

3.3 Vergleich der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion mit IVF-Fertilisationsraten

Von Paaren des IVF-Programmes wurde die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion aus den Ejakulaten, die für die Befruchtung der Eizelle benutzt wurden, bestimmt.

Dabei ergaben sich vor und nach Glaswollfiltration folgende Ejakulatparameter (Tab. 4).

Tab.4: Ejakulatparameter der Patienten vor und nach Glaswollfiltration
(Mittelwert \pm Standardabweichung; Median, Spannweite, n=31)

	Nativejakulat	Ejakulatparameter nach Glaswollfiltration
Spermatozoenkonzentration ($\times 10^6/\text{ml}$)	102,8 \pm 60,4 (80,0; 30-246,4)	24,7 \pm 27,4 (12,8; 4-100)
Globalmotilität	53,6 \pm 8,9 (50,0; 40-70)	83,0 \pm 4,2 (83,0; 70-92)
a Motilität ¹	26,7 \pm 7,2 (25,0; 15-40)	60,9 \pm 6,5 (62,0; 40-70)
b Motilität ¹	17,3 \pm 3,7 (20,0; 10-20)	15,0 \pm 2,6 (15,0; 9-20)
c Motilität ¹	9,5 \pm 1,5 (10,0; 5-10)	6,8 \pm 2,9 (7,0; 1-12)

¹ Anmerkung: Die Globalmotilität wird nach WHO-Kriterien in a- „schnell und linear progressiv bewegliche Spermatozoen“, b- „langsam, träge linear bewegliche oder nicht linear progressiv bewegliche Spermatozoen“ und c- „nicht progressiv bewegliche Spermatozoen“ eingeteilt.

Bei den Ejakulatproben wurde die akrosomale Reaktion mit Ionophor A23187 ausgelöst. Die akrosomale Reaktion wurde nach Markierung mit FITC-PSA bzw. FITC-ConA bestimmt. Die Fertilisationsraten wurden später aus den Daten des IVF-Labors übernommen und den jeweiligen Ejakulaten zugeordnet.

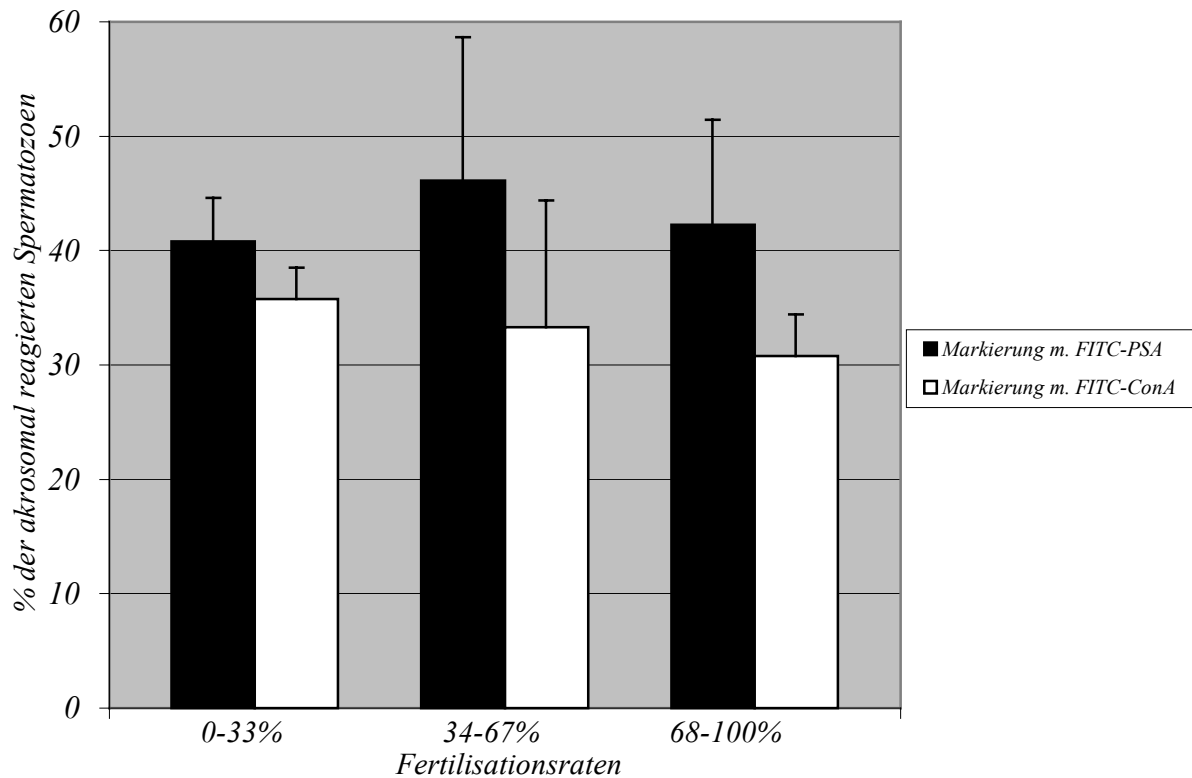
Insgesamt wurden 31 Proben ausgewertet, wobei sich bezüglich der Fertilisationsraten folgende Verteilung ergab (Tab. 5):

Tab.5: Fertilisationsraten nach IVF in Korrelation zu den Ejakulatproben

Fertilisationsraten %	Ejakulate n	Ejakulate %
0-33	3	9,7
33-67	7	22,6
67-100	21	67,8

Vergleicht man die Rate der „insgesamt akrosomal reagierten Spermatozoen“ mit den Fertilisationsraten nach IVF, so zeigt sich keine Beziehung zwischen diesen beiden Faktoren. Dies gilt sowohl für akrosomal induzierte Spermatozoen mit Ionophor A23187 als auch für spontan akrosomal reagierte Spermatozoen. Die Spermatozoen wurden mit FITC-PSA bzw. FITC-ConA markiert (Abb. 19 und 20).

*Abb.19: Beziehung zwischen Fertilisationsraten nach IVF und akrosomaler Reaktion
(insgesamt akrosomal reagierte Spermatozoen) nach Induktion mit Ionophor A23187
(n=31)*



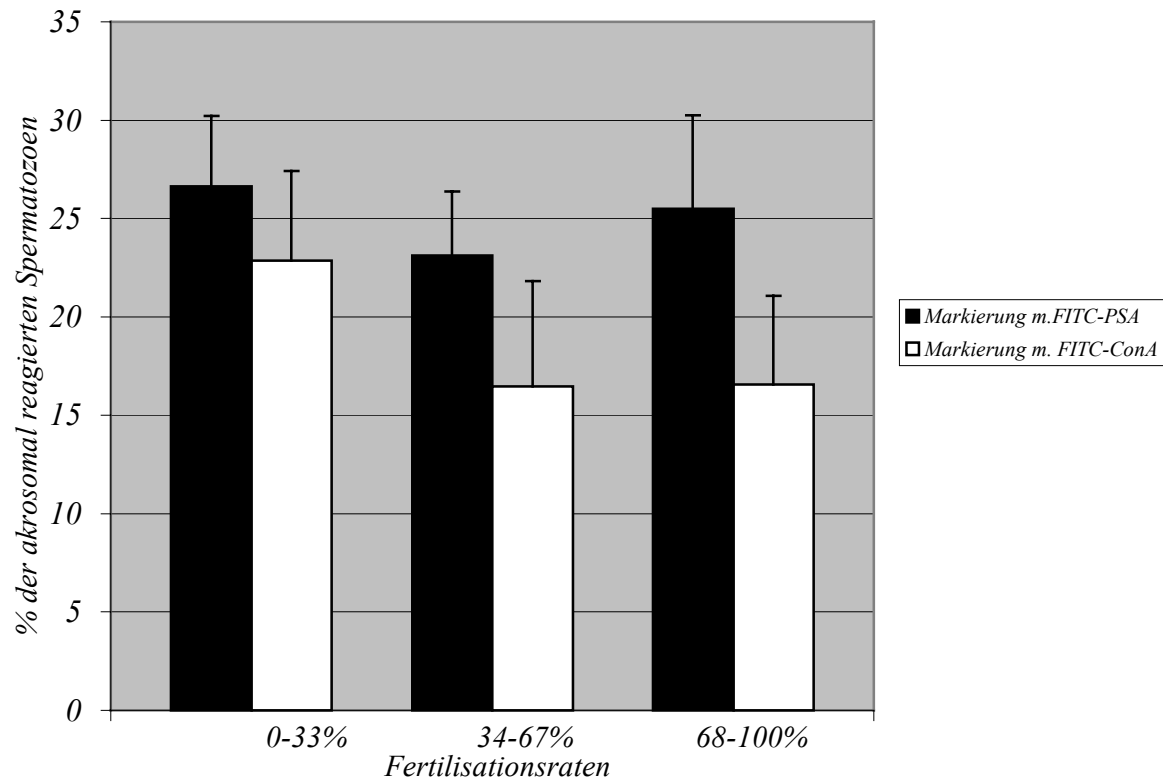
Die Werte wurden getrennt nach den beiden Nachweismethoden (FITC-PSA und FITC-ConA) miteinander verglichen. Danach wurden die Werte mit den jeweiligen Fertilisationsraten in Beziehung gesetzt.

Es werden die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

Es gibt keine signifikanten Beziehungen zwischen der Anzahl an akrosomal reagierte Spermatozoen und den unterschiedlichen Fertilisationsraten.

Statistische Methode: Varianzanalyse

*Abb.20: Beziehung zwischen Fertilisationsraten nach IVF und akrosomaler Reaktion
(insgesamt akrosomal reagierte Spermatozoen) bei spontan akrosomal reagierten
Spermatozoen (Kontrolle mit DMSO) (n=31)*



Die Werte wurden getrennt nach den beiden Nachweismethoden (FITC-PSA und FITC-ConA) miteinander verglichen. Danach wurden die Werte mit den jeweiligen Fertilisationsraten in Beziehung gesetzt.

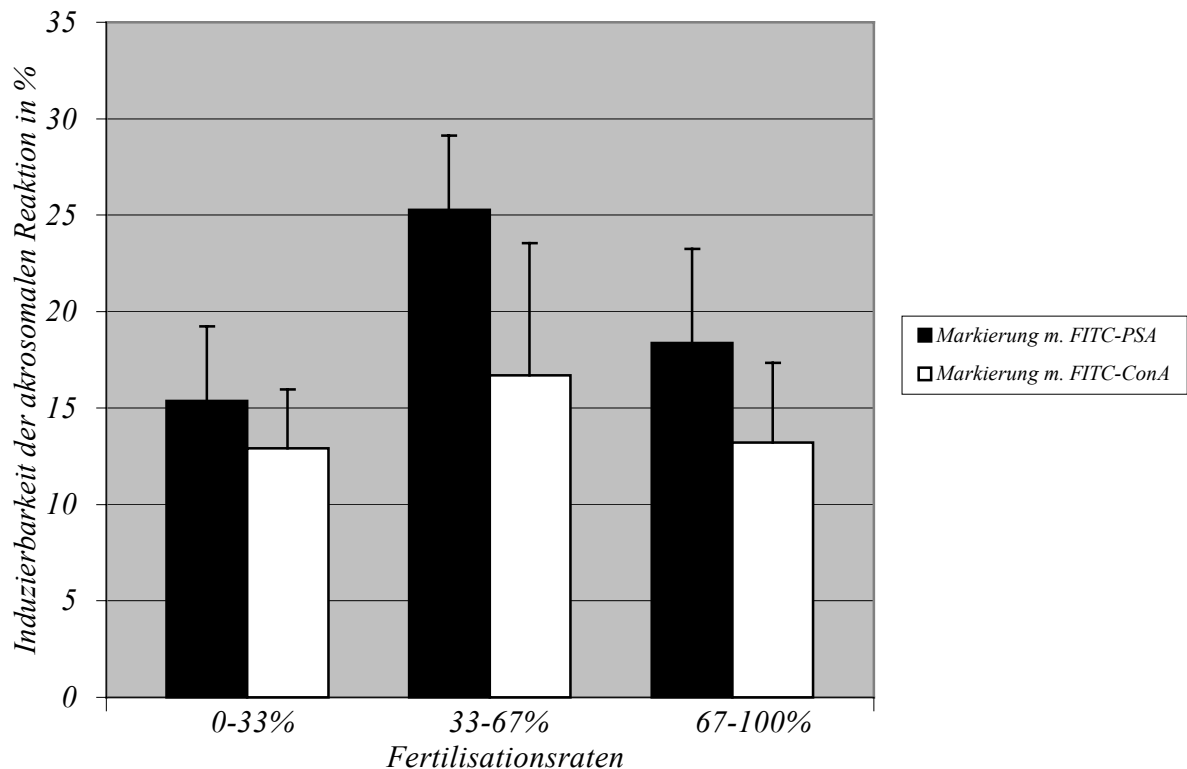
Es werden die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

Es gibt keine signifikanten Beziehungen zwischen der Anzahl an akrosomal reagierten Spermatozoen und den verschiedenen Fertilisationsraten.

Statistische Methode: Varianzanalyse

Auch beim Vergleich der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion (Δ AR) mit den Fertilisationsraten zeigt sich keine statistisch relevante Beziehung (Abb. 21).

Abb.21: Beziehung zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion (insgesamt akrosomal reagierte Spermatozoen) und Fertilisationsraten nach IVF (n=31)



Die Werte wurden getrennt nach den beiden Nachweismethoden (FITC-PSA und FITC-ConA) miteinander verglichen. Danach wurden die Werte mit den jeweiligen Fertilisationsraten in Beziehung gesetzt.

Es werden die Mittelwerte und Standardabweichungen angegeben.

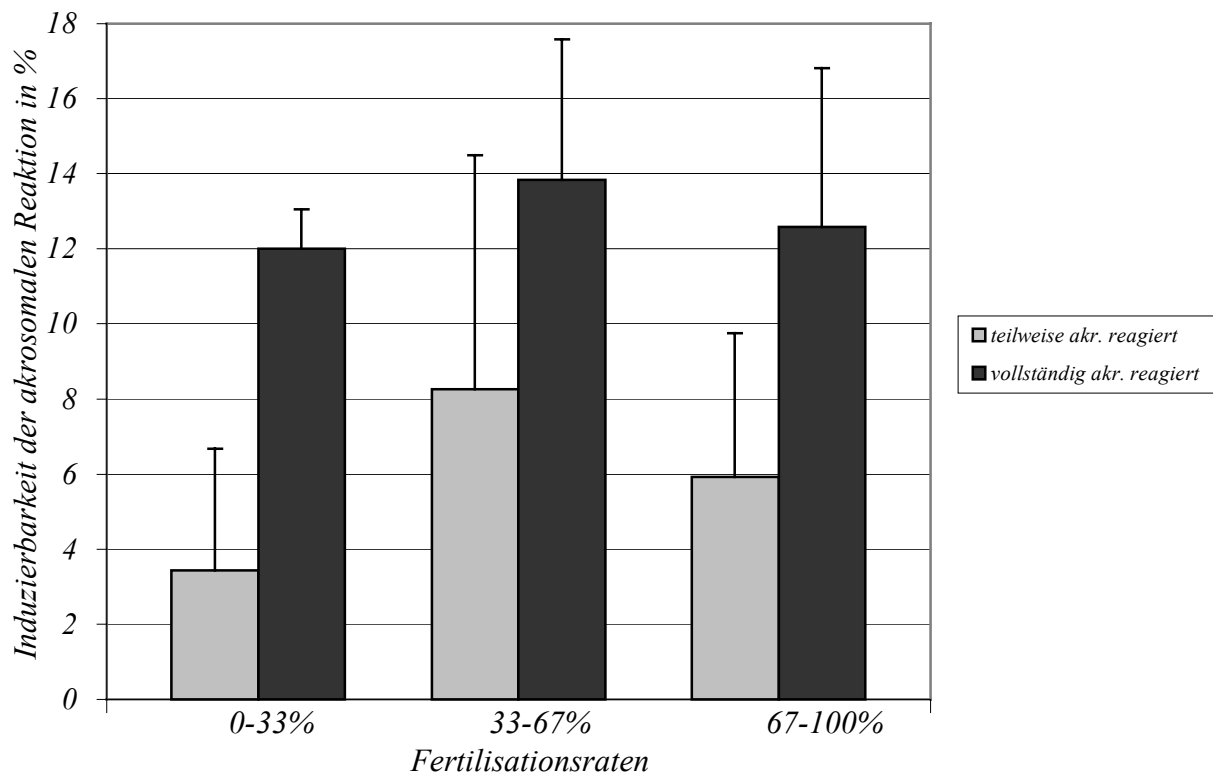
Es gibt keine signifikanten Beziehungen zwischen den berechneten Δ AR-Werten und den unterschiedlichen Fertilisationsraten.

Statistische Methode: Varianzanalyse

Unterteilt man die akrosomal reagierten Spermatozoen in „teilweise“ bzw. „vollständig akrosomal reagiert“ und vergleicht diese mit den Fertilisationsraten nach IVF zeigt sich ebenfalls keine statistisch relevante Beziehung.

Die Ergebnisse werden in Abbildung 22 und 23, getrennt nach Markierung mit FITC-ConA bzw. FITC-PSA dargestellt.

Abb.22: Beziehung zwischen Δ AR-Werten (teilweise und vollständig akrosomal reagierte Spermatozoen) und Fertilisationsraten nach IVF, Markierung mit FITC-PSA (n=31)



Die Werte wurden nach Markierung mit FITC-PSA einzeln für die Gruppen „teilweise akrosomal reagiert“ und „vollständig akrosomal reagiert“ bestimmt und miteinander verglichen. Danach wurden die Werte mit den jeweiligen Fertilisationsraten in Beziehung gesetzt.

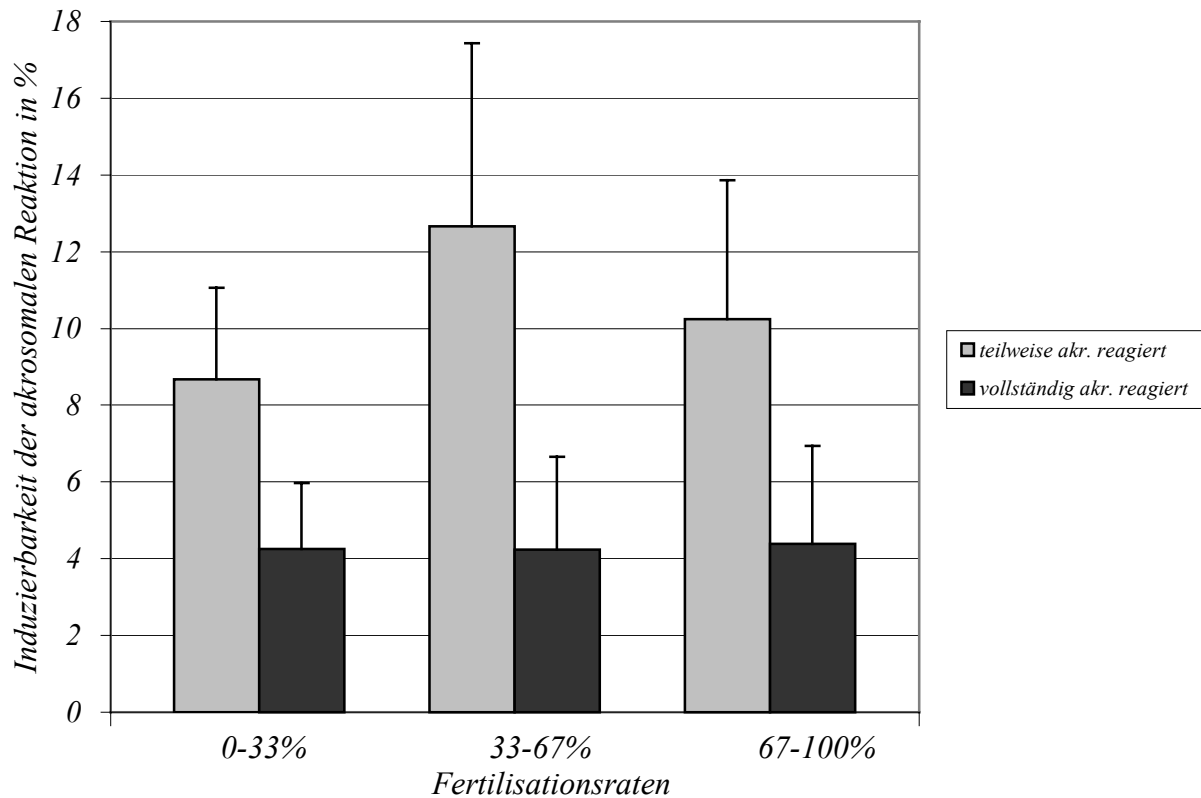
Es werden Mittelwerte und Standardabweichung angegeben.

Es gibt keine signifikanten Beziehungen zwischen den berechneten Δ AR-Werten und den unterschiedlichen Fertilisationsraten.

Statistische Methode: Varianzanalyse

Die fehlende Beziehung zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und den Fertilisationsraten nach IVF gilt sowohl nach Markierung der Spermatozoen mit FITC-PSA, wie auch nach FITC-ConA Markierung.

Abb.23: Beziehung zwischen den Δ AR- Werten (teilweise und vollständig akrosomal reagierte Spermatozoen) und Fertilisationsraten nach IVF, Markierung mit FITC-ConA (n=31)



Die Werte wurden nach Markierung mit FITC-ConA einzeln für die Gruppen „teilweise akrosomal reagiert“ und „vollständig akrosomal reagiert“ bestimmt und miteinander verglichen. Danach wurden die Werte mit den jeweiligen Fertilisationsraten in Beziehung gesetzt.

Es werden Mittelwerte und Standardabweichung angegeben.

Es gibt keine signifikanten Beziehungen zwischen den berechneten Δ AR-Werten und den unterschiedlichen Fertilisationsraten.

Statistische Methode: Varianzanalyse

4. Diskussion

4.1 Vergleich zwischen FITC-PSA und FITC-ConA

4.1.1 Bedeutung der Diagnostik der akrosomalen Reaktion und Auswahl der Lektine

Die akrosomale Reaktion ist ein wichtiger physiologischer Vorgang, der die Voraussetzung für die Fertilisation der weiblichen Eizellen darstellt (Moore und Bedford 1983).

Ohne ein morphologisch intaktes Akrosom ist die Penetration der Eizelle und damit die Fertilisation nicht möglich (Schill et al. 1988).

Die Kenntnis des Prozentsatzes der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und der Ursache akrosomaler Schäden ist deswegen für die Infertilitätsdiagnostik bei Paaren mit unerfülltem Kinderwunsch bedeutend (Schill et al. 1988).

Neben dem genaueren Verständnis der zellbiologischen Vorgänge während der akrosomalen Reaktion ist auch die Erforschung von Nachweismethoden zur Erfassung von akrosomal reagierten Spermatozoen notwendig.

In der Vergangenheit wurden viele Nachweismethoden zur Darstellung akrosomal reagierter Spermatozoen entwickelt:

Färbung mit Bismarckbraun und Bengalrosa (Triple Stain oder double Stain Technik)	Talbot und Chacon 1981, De Jonge et al. 1989, Sánchez et al. 1995
Monoklonale Antikörper	Kallajoki et al. 1986, Moore et al. 1987, Ohashi et al. 1992, Parinaud et al. 1993, Dorjee et al. 1996
Chlortetrazyklin	DasGupta et al. 1993, Perry et al. 1995
Fluoreszierende Lektine:	
Ricinus communis-Agglutinin (FITC-RCA)	Talbot und Chacon 1980

Peanut-Agglutinin (FITC-PNA)	Mortimer et al. 1987, 1990, Aitken et al. 1993
Pisum sativum (FITC-PSA)	Cross et al. 1986, Mendoza et al. 1992, Aitken und Brindle 1993, Henley et al. 1994, Köhn et al. 1996
Concanavalin A Lektin (FITC-ConA)	Holden et al. 1990

Die angewendeten Markierungsmethoden sollen reproduzierbar, zuverlässig, einfach durchzuführen und billig sein, damit sie in der Routinediagnostik verwendet werden können. Gemäß dem WHO-Handbuch von 1993 sind fluoreszierende Lektine am einfachsten zu handhaben und billiger als z.B. monoklonale Antikörper (WHO-Laborhandbuch 1993). Deswegen wurde in dieser Arbeit FITC-PSA und FITC-ConA verwendet.

Wichtig ist außerdem, das man die verschiedenen Markierungsmethoden untereinander vergleicht, um so eine Reproduzierbarkeit in verschiedenen Laboratorien zu gewährleisten.

In anderen Arbeiten wurde die Markierung mit Lektinen anderen Methoden gegenübergestellt. Allerdings wurden bis jetzt nur selten verschiedene fluoreszierende Lektine, z.B. FITC-PSA und FITC-ConA, gleichzeitig miteinander verglichen:

Vergleich PSA, PNA, monoklonale Antikörper	Aitken und Brindle 1993
Vergleich PSA und Chlortetrazyklin	DasGupta et al. 1993
Vergleich PSA, PNA, ConA	Kinger und Rajalakshmi 1995
Vergleich PSA, PNA, TPA	D'Cruz und Haas 1996
Vergleich ConA, PNA, monoklonale Antikörper	Fierro et al. 1996
Vergleich PSA, ConA, Double Stain	Köhn et al. 1997

4.1.2 Lektine

Lektine sind Proteine bzw. Glykoproteine vor allem pflanzlichen Ursprungs mit spezifischer Affinität zu bestimmten Saccharidstrukturen. Sie binden an spezielle Regionen des Spermatozoenkopfes und sind so wichtige Bestandteile bei der funktionellen Spermatozoendiagnostik (Trowbridge 1974, Koehler 1981).

Sowohl der akrosomale Inhalt als auch die akrosomale Membran enthalten Glykoproteine und sind so in der Lage, Lektine zu binden (Yanagimachi 1981, Cross et al. 1986).

Um diese Bindungen unter dem Mikroskop sichtbar zu machen, werden Lektine mit fluoreszierenden Substanzen, vor allem fluoreszierendem Isothiocyanat (FITC) kombiniert (van Lis und Kalsbeek 1972, Cross und Meizel 1989).

4.1.3. Vergleich der Anzahl akrosomal reagierter Spermatozoen bei Markierung mit FITC-ConA und FITC-PSA

Bei dem Vergleich von FITC-ConA und FITC-PSA stellten Kinger und Rajalakshmi (1995) und Köhn et al. (1997) Unterschiede in Erfassung der Anzahl akrosomal reagierter Spermatozoen und deren Induzierbarkeit fest, was auch in dieser Arbeit bestätigt werden kann.

Dabei liegt in der vorliegenden Untersuchung die Anzahl akrosomal reagierter Spermatozoen bei Markierung mit FITC-ConA signifikant unter der entsprechenden Ergebnisse mit FITC-PSA.

Im Durchschnitt können bei Markierung mit FITC-PSA 10% mehr Spermatozoen als „insgesamt akrosomal reagiert“ identifiziert werden als bei Markierung mit FITC-ConA (siehe 3.1).

Als Ursache dieser quantitativen Unterschiede bei Markierung mit den beiden fluoreszierenden Lektinen werden verschiedene Gründe vermutet:

1. Die unterschiedlichen Bindungsstellen der zwei Lektine

Pisum sativum-Agglutinin ist ein Lektin, welches aus Erbsen gewonnen wird und die Fähigkeit besitzt, an α -D-Mannose und α -D-Glucose zu binden (Trowbridge 1974, Cross et al. 1986). Desweiteren reagiert es mit Bestandteilen des akrosomalen Inhaltes, vor allem mit

Proakrosin (Mendoza et al. 1992). Damit bindet PSA vor allem an den akrosomalen Inhalt und markiert diesen (Cross et al. 1986, Mendoza et al. 1992).

Akrosomal intakte Spermatozoen mit vollständig erhaltenem akrosomalen Inhalt werden nach Permeabilisierung der akrosomalen Membran durch FITC-PSA markiert. Während der akrosomalen Reaktion geht der akrosomale Inhalt verloren, so daß die Fluoreszenz mit fortschreitender akrosomaler Reaktion abnimmt. Vollständig akrosomal reagierte Spermatozoen werden nicht markiert (Cross et al. 1986, Mendoza et al. 1992).

Concanavalin A wird aus *Canavalia ensiformis* (jack beans) hergestellt. Es bindet an α -D-Glykopyranosyl, α -D-Mannopyranosyl, β -D-Fructofuranosyl und α -D-Arachinofuranosyl (van Lis und Kalsbeek 1972) und markiert die innere akrosomale Membran (Koehler 1981, Holden et al. 1990, Fierro et al. 1996).

Voraussetzung für die Markierung von Spermatozoen mit FITC-ConA ist somit die Freilegung der inneren akrosomalen Membran durch Verlust des akrosomalen Inhaltes (Holden et al. 1990).

Akrosomal intakte Spermatozoen werden durch FITC-ConA nicht markiert.

Vollständig akrosomal reagierte Spermatozoen zeigen bei Markierung mit FITC-ConA eine gleichmäßige Fluoreszenz der vorderen Kopfregion.

Man kann aus den unterschiedlichen Bindungsverhalten schließen, daß ConA erst spätere Stadien der akrosomalen Reaktion mit dem Beginn der Freilegung der inneren akrosomalen Membran erfaßt (Kinger und Rajalakshmi 1995).

Deswegen liegt die Vermutung nahe, daß durch Markierung mit FITC-ConA eine geringere Anzahl an akrosomal reagierten Spermatozoen als mit FITC-PSA gemessen wird.

2. Die unterschiedliche Fixierung der Spermatozoen bei den beiden Markierungsmethoden

Zur Markierung der Spermatozoen mit FITC-PSA werden die Spermatozoen in 100%igem Methanol inkubiert.

Methanol permeabilisiert die Zellmembran, so daß PSA in das Akrosom gelangen kann. Dabei hat Methanol keinen Einfluß auf das Bindungsverhalten von PSA an die Bestandteile der Spermatozoen (Haas et al. 1988, Mendoza et al. 1992).

Bei Markierung der Spermatozoen mit FITC-ConA werden die Spermatozoen in 10%igem, neutral gepuffertem Formalin inkubiert. Formalin bewirkt eine Erhöhung der Membranpermeabilität, ohne die Membranintegrität zu zerstören. So gelangt ConA in die Spermatozoen (Cross et al. 1986, Haas et al. 1988).

Allerdings vermindern Aldehyde die Affinität von Lektinen zu ihren Bindungsstellen in den Spermatozoen (Koehler et al. 1981, Holden et al. 1990).

Durch die mit der unterschiedlichen Fixierung einhergehende unterschiedliche Affinität der beiden Lektine zu ihren Spermatozoenstrukturen läßt sich die kleinere Anzahl an akrosomal reagierten Spermatozoen bei Markierung mit FITC-ConA im Gegensatz zur Markierung mit FITC-PSA erklären.

Köhn et al. (1997) zeigte beim Vergleich der Anzahl akrosomal reagerter Spermatozoen nach Markierung mit FITC-PSA bzw. FITC-ConA und transmissionselektronenmikroskopischen Aufnahmen (TEM), daß der Prozentsatz der akrosomal reagierten Spermatozoen bei TEM höher lag als bei den Markierungen mit Lektinen. Dabei waren die Prozentsätze bei Markierung mit FITC-PSA 1,3-2,1fach tiefer und bei Markierung mit FITC-ConA 2,5-4,7fach tiefer als die TEM-Vergleichswerte. Diese Ergebnisse stützen die oben genannte Annahme.

4.1.4. Differenzierung zwischen teilweise und vollständig akrosomal reagierten Spermatozoen

Um die oben genannten Unterschiede zwischen den beiden Fluoreszenzmethoden beim Nachweis des Anteils akrosomal reagerter Spermatozoen genauer zu untersuchen, wurden die akrosomal reagierten Spermatozoen in „teilweise“ und „vollständig akrosomal reagiert“ unterteilt.

Dabei galten bei Markierung mit FITC-PSA bzw. FITC-ConA als „teilweise akrosomal reagiert“ Spermatozoen mit fleckiger Fluoreszenz des Akrosoms (siehe 2.6., Köhn et al. 1997).

Als „vollständig akrosomal reagiert“ wurden Spermatozoen klassifiziert, die bei Markierung mit FITC-ConA eine vollständige Fluoreszenz des Akrosoms aufwiesen, bzw. bei Markierung mit FITC-PSA keine Fluoreszenz des vorderen Spermatozoenkopfes zeigten.

Eine solche Einteilung wurde bereits von Kinger und Rajalakshmi (1995) für FITC-ConA und PNA durchgeführt.

Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit zeigen beim Anteil „teilweise akrosomal reagierter Spermatozoen“ ähnliche Ergebnisse zwischen den beiden Lektinen. Allerdings liegt die Anzahl an „vollständig akrosomal reagierten Spermatozoen“ bei Markierung mit FITC-PSA deutlich über der vergleichbaren Anzahl nach Markierung der Spermatozoen mit FITC-ConA (siehe 3.1).

Im Durchschnitt beträgt der Unterschied bei „teilweise akrosomal reagierten Spermatozoen“ 2% bei induzierten Spermatozoen. Bei spontan akrosomal reagierten Spermatozoen liegt der Unterschied etwas höher.

Bei den vollständig „akrosomal reagierten Spermatozoen“ beträgt der Unterschied im Durchschnitt 11% nach Induktion der akrosomalen Reaktion mit Ionophor A23187 oder dbcAMP und 6% bei spontan akrosomal reagierten Spermatozoen.

Durch die unterschiedlichen Bindungsstellen der Lektine hätte man ein anderes Ergebnis erwartet:

Durch seine Bindung an die innere akrosomale Membran und damit die erst zum späteren Zeitpunkt der akrosomalen Reaktion beginnende Markierung der Spermatozoen hätte man von der ConA Markierung eine kleinere Anzahl an „teilweise akrosomal reagierten Spermatozoen“ und eine gleich große Anzahl an „vollständig akrosomal reagierten Spermatozoen“ im Vergleich zur Markierung mit PSA annehmen können.

Die sich hier anders darstellenden Ergebnisse können durch verschiedene Hypothesen gedeutet werden:

1. Bei „vollständig akrosomal reagierten Spermatozoen“ liegt nach Angaben von früheren elektronenmikroskopischen Untersuchungen die innere akrosomale Membran frei. Allerdings finden sich häufig noch membrangebundene Vesikel und Reste der äußeren akrosomalen Membran an die innere akrosomale Membran angelagert (Nagae et al. 1986, Stock und Fraser 1987).

Diese Reste könnten für ein nicht vollständiges Freiliegen der inneren akrosomalen Membran und damit für eine nur fleckige Fluoreszenz der Spermatozoen bei Markierung mit FITC-ConA verantwortlich sein. Dadurch würde man bei der

Auszählung akrosomal reagierter Spermatozoen „vollständig akrosomal reagierte Spermatozoen“ fälschlich als „teilweise akrosomal reagiert“ einstufen.

Da PSA an den akrosomalen Inhalt bindet, der weitgehend vollständig bei der akrosomalen Reaktion verloren geht (Nagae et al. 1986, Stock und Fraser 1987), werden bei dieser Markierung zuverlässiger „teilweise akrosomal reagierte Spermatozoen“ von „vollständig akrosomal reagierten“ unterschieden.

2. Bei der Markierung mit FITC-ConA könnte durch Auflagerung von Zytoplasmatropfen oder anderen Zellbestandteilen auf das Akrosom eine nur unvollständige Fluoreszenz vorgetäuscht und in Wahrheit „vollständig akrosomal reagierte Spermatozoen“ nicht als solche erkannt werden.
3. Die oben bereits genannte, durch die Spermatozoenfixierung bedingte, im Vergleich zu PSA geringere Affinität von ConA zu der inneren akrosomalen Membran könnte für eine geringere Sensitivität gegenüber den akrosomal reagierten Spermatozoen und damit für eine reduzierte Markierung verantwortlich sein.
4. ConA bindet nicht nur an die innere akrosomale Membran, sondern auch an die Spermatozoenoberfläche, unabhängig vom akrosomalen Status (van Lis und Kalsbeek 1972, Cross und Overstreet 1987). Auch dadurch könnte ein fleckiges Fluoreszenzmuster verursacht werden, welches unabhängig vom akrosomalen Status ist.
5. Ebenso könnten technische Probleme bei der Spermatozoenzählung die Ergebnisse beeinflussen.

Um zwischen „vollständig“ und „teilweise akrosomal reagierten Spermatozoen“ zu unterscheiden, muß man nach Markierung mit FITC-ConA bei der Auszählung zwischen gleichmäßig fluoreszierenden Spermatozoen und Spermatozoen mit fleckiger Fluoreszenz differenzieren. Da der Übergang zwischen diesen beiden Zuständen jedoch fließend verläuft, sind quantitative Fehler bei der Auszählung nicht auszuschließen.

Nach Markierung mit FITC-PSA wurde bei der Differenzierung von „teilweise“ und „vollständig akrosomal reagierten Spermatozoen“ zwischen fleckiger und fehlender Fluoreszenz unterschieden. Die Unterscheidung ist hier sicherlich leichter.

4.1.5 Induktion der akrosomalen Reaktion mit verschiedenen Induktoren

Um Ergebnisse verschiedener Laboratorien vergleichbar zu machen, bedarf es außer der Kenntnis über die Reproduzierbarkeit zwischen verschiedenen Färbemethoden einheitlicher Stimulationsprotokolle.

Induktoren sind nötig, da bei Spermatozoen in vitro eine spontane akrosomale Reaktion nur in einem geringen und stark schwankenden Prozentsatz vorkommt (Talbot und Chacon 1981, Suarez et al. 1986, Byrd und Wolf 1986, De Jonge et al. 1989, Bielfeld et al. 1994).

Das Stimulationsprotokoll berücksichtigt Art des Mediums und Vorbehandlung der Spermatozoen, Kapazitationsdauer, Induktoren bzw. Stimulus der akrosomalen Reaktion und Dauer der Stimulation.

Die akrosomale Reaktion kann u.a. durch verschiedene Stimuli induziert werden.

Progesteron	Meizel 1995, Parinaud et al. 1996
Follikular- und Ovarialflüssigkeit	Meizel 1985, Sidhu und Gurya 1989, Gearon et al. 1994
Zona pellucida	Cross et al. 1988, Tesarik et al. 1988b
Cumulus oophorus	White et al. 1990, Carrell et al. 1993
Pentoxiphyllin	Gearon et al. 1994
Ionophor A23187	Russell et al. 1979, De Jonge et al. 1989, White et al. 1990, Cummins et al. 1991
dbcAMP	De Jonge et al. 1989, 1991a, Anderson et al. 1992

In der vorliegenden Arbeit wurde der in früheren Arbeiten sehr häufig benutzte Induktor Ionophor A23187 mit dbcAMP verglichen.

Beide Stimulationsprotokolle sind einfach anzuwenden und billig.

Ionophor A23187, eine Carbonsäure, kann die akrosomale Reaktion im Beisein von Calciumionen durch Erhöhung des Calciumeinflusses in die Spermatozoen induzieren

(Russell et al. 1979, Jamil und White 1981; Jamil, White und Dwarde 1982, Aitken et al. 1984, De Jonge et al. 1989, 1991a, Bielfeld 1994, Liu und Baker 1990b, 1995, 1996).

Die morphologischen Veränderungen in den Spermatozoen bei Induktion mit Ionophor A23187 entsprechen denen spontan reagierter Spermatozoen (Russell et al. 1979).

In diesem Versuch entsprachen die experimentellen Bedingungen dem Stimulationsprotokoll nach Byrd und Wolf (1986). Danach wurde die akrosomale Reaktion mit einer Ionophorkonzentration von 10 μ M ausgelöst. Die Inkubationsdauer betrug 60 Minuten (siehe 2.4.1). Nach Byrd und Wolf (1986) zeigt diese Dosierung die stärkste Induktion der akrosomalen Reaktion. Dieses Ergebnis wurde von Köhn et al. (1997) bestätigt.

Höhere Dosierungen brachten keine weitere Steigerung der Rate akrosomal reagierter Spermatozoen, da Ionophor mit höherer Konzentration zelltoxisch wirkt (Aitken et al. 1984).

Bezüglich der Länge der Inkubation gibt es widersprüchliche Aussagen in der Literatur.

Die meisten Autoren beschreiben eine maximale Stimulation der akrosomalen Reaktion nach 60minütiger Inkubation (Byrd und Wolf 1986, Aitken et al. 1993, Amin et al. 1996, Köhn et al. 1997). Allerdings bemerkten De Jonge et al. (1989) eine signifikante Erhöhung akrosomal reagierter Spermatozoen schon nach 15minütiger Inkubation.

Zur Bedeutung der Kapazitation bei Induktion der akrosomalen Reaktion mit Ionophor A23187 finden sich in der Literatur unterschiedliche Angaben.

Keinen Einfluß der Kapazitation auf die Induktion der akrosomalen Reaktion durch Ionophor A23187 werden von Holden und Trounson (1992) und Bielfeld et al. (1994) berichtet.

Entgegengesetzt dazu wird eine Erhöhung der akrosomal reagierten Spermatozoen nach Kapazitation beschrieben bei Lee et al. (1987), De Jonge et al. (1989) und Byrd, Tsu und Wolf (1989).

In der vorliegenden Arbeit wurde eine Kapazitation von 3 Stunden durchgeführt.

Dibutyryl cyclic AMP ist ein Analogon zum second messenger cAMP und induziert die akrosomale Reaktion durch Aktivierung von Proteinkinase. Eine ausreichend lange Kapazitation von 3 Stunden ist dabei nötig (De Jonge et al. 1989, 1991a, Anderson et al. 1992).

Im Gegensatz zu Ionophor benötigt dbcAMP kein Calcium im Medium (De Jonge et al. 1989, 1991a, Anderson et al. 1992).

Beim Vergleich der beiden Induktoren miteinander zeigen sich übereinstimmende Ergebnisse bei der Anzahl akrosomal reagierter Spermatozoen. Die Ergebnisse stimmen sowohl bei der Anzahl „insgesamt akrosomal reagierter Spermatozoen“, als auch bei Unterteilung dieser in „teilweise“ und „vollständig“ akrosomal reagierte Spermatozoen überein.

4.1.6 Schwierigkeiten bei der Auszählung der markierten Spermatozoen

Die nach Versuchsprotokoll behandelten Spermatozoen wurden, je nach ihrer Fluoreszenz, in „nicht akrosomal reagiert“ und „akrosomal reagiert“ unterteilt, wobei die akrosomal reagierten Spermatozoen noch einmal in „teilweise“ und „vollständig akrosomal reagiert“ gegliedert wurden (siehe 2.6).

Diese Unterteilung der Spermatozoen nach ihrer Fluoreszenz ist teilweise relativ schwierig, da es Übergangsbereiche zwischen den einzelnen Stadien gibt. Besonders bei der Unterscheidung zwischen fleckiger und vollständiger Fluoreszenz ergeben sich immer wieder Unsicherheiten in der Interpretation. Bei genauerer Betrachtung eines Akrosoms fallen teilweise Unregelmäßigkeiten der Fluoreszenz auf, so daß die Einstufung in „vollständig“ oder „inhomogen“ fluoreszierend schwierig sein kann.

Daraus läßt sich schließen, daß die Ergebnisse von der individuellen Interpretation abhängen und es so zu unterschiedlichen Ergebnissen bei verschiedenen Beobachtern kommen kann.

Wie hoch dieser individuelle Fehler liegt, müssen zukünftige Arbeiten zeigen.

4.2 Intraindividuelle Schwankungen der akrosomalen Reaktion

Schwankungen der Ejakulatqualität bei fertilen Männern sind bekannt (Cooper et al. 1991, Ombelet et al. 1996).

Wie in dieser Arbeit gezeigt, ändert sich auch die akrosomale Reaktion bei fertilen Männern über einen Zeitraum von einem Jahr.

Dabei schwanken sowohl Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion, wie auch die Anzahl „teilweise“, „vollständig“ und „insgesamt akrosomal reagierter Spermatozoen“. Die Schwankungsbreite beträgt dabei bis höchstens 25 Prozentpunkte.

Bei der Rate der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion liegt die Schwankungsbreite bei höchstens 18 Prozentpunkten.

Dabei liegt keiner der gefundenen Werte für die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion unter 10%.

Dieses Ergebnis stimmt tendenziell mit den Ergebnissen der Literatur überein.

So fanden z.B. Yovich et al. (1994) bei einer Gruppe von 53 fertilen Probanden keine Werte bei der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion durch Ionophor unter 5%, wobei er wie auch Cummins et al. (1991) von einem cut-off Wert von 10% bei der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion ausging.

Da die gemessenen Werte in der eigenen Untersuchung alle im nicht pathologischen Bereich liegen, kann davon ausgegangen werden, daß die Schwankungen der akrosomalen Reaktion wie auch Schwankungen der Ejakulatparameter zufällig auftreten und nur einen geringen Einfluß auf die Fertilität des Mannes haben.

Die Ursachen sind wahrscheinlich vielseitig. Ombelet et al. (1996) beschreiben als Gründe für Schwankungen der Ejakulatparameter unter anderem Unterschiede der Testosteron- und Gonadotropinproduktion, Coitusfrequenz, Temperaturschwankungen und soziale Ursachen.

Desweiteren müssen auch hier sicherlich methodische Ursachen, wie z.B. unterschiedliche Untersucher, berücksichtigt werden.

Diese Ursache scheidet bei der vorliegenden Arbeit allerdings aus, da die Ejakulatproben immer unter selben Versuchsbedingungen, im selben Labor und vom gleichen Untersucher bearbeitet und ausgewertet wurden.

4.3 Korrelation der Induktion der akrosomalen Reaktion mit Fertilisationsraten nach IVF

Die akrosomale Reaktion und die Spermatozoen-Zona pellucida Bindung spielen bei der Fertilisation in vivo eine essentielle Rolle (Overstreet et al. 1980, Sathananthan et al. 1982, Overstreet und Cross 1988, Calvo et al. 1989, Fenichel et al. 1991).

Nur vollständig akrosomal reagierte Spermatozoen können an die Plasmamembran der Eizelle binden und mit der Eizelle fusionieren (Yanagimachi 1981, Talbot und Chacon 1982, Byrd und Wolf 1986). Somit sind Dysfunktionen des Akrosoms mit einer Verminderung der Fertilität assoziiert (Schill et al. 1988, Liu und Baker 1990a).

Aus diesen Angaben läßt sich die These ableiten, daß auch eine Korrelation zwischen der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und Fertilisationsraten in vitro besteht.

Zur Behandlung der Infertilität werden heute zunehmend mehr Methoden der assistierten Reproduktion eingesetzt (z.B. In-vitro-Fertilisation (IVF) und Intrazytoplasmatische Spermatozoen-Injektion (ICSI)).

Verschiedene Gründe sind für eine ausbleibende Fertilisierung und Schwangerschaft nach IVF möglich. Neben technischen sind vor allem andrologische und gynäkologische Faktoren von Bedeutung.

So sind Spermatozoenmorphologie,- motilität und -vitalität mit den Fertilisationsraten korreliert (Kruger et al. 1986, 1988, Liu und Baker 1988, Calvo et al. 1994, Parinaud et al. 1995a, 1995b, Sukcharoen et al. 1996).

Ob auch die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion einen prädiktiven Wert bei der Vorhersage von Fertilisationsraten eine Rolle spielt, wird in der Literatur kontrovers diskutiert. Positive Korrelationen des akrosomalen Status mit Fertilisationsraten und IVF ergaben Studien von Fenichel et al. (1991), Takahashi et al. (1992), Yovich et al. (1994), Calvo et al. (1994), Avrech et al. (1997) und Liu und Baker (1998).

Keine Korrelation der akrosomalen Reaktion mit IVF-Fertilisationsraten fanden Plachot et al. (1984), van Kooij et al. (1986) und Lange et al. (1992).

Unterschiedliche Ergebnisse abhängig vom Stimulator der akrosomalen Reaktion beschreiben Cummins et al. (1991), Henkel et al. (1993), Tasdemir et al. (1993), Krausz et al. (1995, 1996) und Parinaud et al. (1995a, 1995b).

Bei den genannten Experimenten wurde die akrosomale Reaktion mit unterschiedlichen Methoden induziert und teilweise nur die Rate spontan akrosomal reagierter Spermatozoen gemessen (Tab. 6).

Tab.6: Korrelation der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion mit IVF Fertilisationsraten

Studienname	Anzahl der Patienten	Induktor der AR	Auslösung der AR	Färbemethoden	Ergebnis
Avrech et al. 1997	54 26	Ionophor A23187 Follikularflüssigkeit	i-s i-s	FITC- PSA	Korrelation vorhanden Korrelation vorhanden
Krausz et al. 1996	53 60	Ionophor A23187 Progesteron	s i-s s i-s	FITC- PNA	Keine Korrelation Korrelation vorhanden Keine Korrelation Korrelation vorhanden
Krausz et al. 1995	16	Progesteron	i s	FITC-PNA	Korrelation vorhanden Keine Korrelation
Parinaud et al. 1995a	131	Ionophor A23187 Phorboldestier	i-s i-s	Monoklonale Ak FITC-GB24	Korrelation vorhanden Korrelation vorhanden

Parinaud et al. 1995b	117	Ionophor A23187 dbc AMP Progesteron Follikularflüssigkeit Phorboldiester	i-s i-s i-s i-s i-s	FITC- GB 24	Korrelation vorhanden Keine Korrelation Keine Korrelation Keine Korrelation Korrelation vorhanden
Calvo et al. 1994	232	Follikularflüssigkeit	i	FITC- PSA	Korrelation vorhanden
Yovich et al. 1994	121	A23187	i-s	FITC- PSA	Korrelation vorhanden
Tasdemir et al. 1993	51	Ionophor A23187 Pentoxiphyllin	i i-s i i-s	FITC- PSA	Korrelation vorhanden Korrelation vorhanden Keine Korrelation Keine Korrelation
Henkel et al. 1993	74	Kälteexposition	i i-s	Triple Stain	Keine Korrelation Korrelation vorhanden
Lange et al. 1992	35	Kein Induktor	s	Triple Stain	Keine Korrelation

Takahashi et al. 1992	41	Kein Induktor	s	FITC- Con A	Keine Korrelation
Fenichel et al. 1991	41	Ionophor A23187	i s	Monoklonale Ak FITC-GB24	Korrelation vorhanden Korrelation vorhanden
Cummins et al. 1991	79	Ionophor A23187	i-s s i	FITC- PSA	Korrelation vorhanden Keine Korrelation Korrelation vorhanden
Van Kooij et al. 1986	12	Kein Induktor	s	Triple Stain	Keine Korrelation
Plachot et al 1984	56	Kein Induktor	s	Triple Stain	Keine Korrelation

I= induzierte akrosomale Reaktion

S= spontane (nicht induzierte) akrosomale Reaktion

In dieser Arbeit kann keine Korrelation zwischen der Induktion bzw. Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und den IVF-Fertilisationsraten gezeigt werden.

Die Spermatozoen wurden mit Ionophor A23187 induziert und die akrosomal reagierten Spermatozoen mit Hilfe von FITC-PSA und FITC-ConA Markierung ausgezählt.

Auch die Unterteilung in „teilweise“ und „vollständig akrosomal reagierte Spermatozoen“, ergibt keine signifikante Korrelationen mit den IVF-Fertilisationsraten.

Das Patientenkollektiv ist allerdings mit 31 Patienten klein. Desweiteren wurden nur Patienten mit normalen, d.h. über den WHO-Richtlinien liegenden Ejakulatparametern untersucht, da Patienten mit pathologischen Ejakulatparametern entweder dem ICSI-Programm zugeführt wurden oder durch die nötige aufwendigere Ejakulataufbereitung kein überfälliges Ejakulat, das zu dieser Untersuchung hätte benutzt werden können, mehr vorhanden war.

Auch liegt der Prozentsatz der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion bei fast allen Patienten (bis auf 2 Ausnahmen) über 10%.

In vergleichbaren Studien findet sich aber ein Abfall der Fertilisationsraten vor allem bei Induktionsraten der akrosomalen Reaktion unter 10 bzw. 5% (Takahashi et al. 1992, Yovich et al. 1994, Calvo et al. 1994).

Verschiedene Resultate in der Literatur ergeben sich bezüglich einer Korrelation zwischen spontan akrosomal reagierten Spermatozoen und Fertilisationsraten.

Die meisten Autoren konnten keine Korrelation spontan akrosomal reagierter Spermatozoen mit den IVF-Fertilisationsraten erkennen (Plachot et al. 1984, van Kooij et al. 1986, Liu und Baker 1992, Tasdemir et al. 1993, Krausz et al. 1995, 1996).

Eine Korrelation zwischen spontan akrosomal reagierten Spermatozoen nach 24stündiger Kapazitation und den IVF-Fertilisationsraten zeigten Parinaud et al. (1995b). Auch Fenichel et al. (1991) fanden eine positive Korrelation mit spontan akrosomal reagierten Spermatozoen.

Spermatozoendysfunktionen können einzeln oder kombiniert während verschiedener Phasen der Fertilisation auftreten, z.B. während der Zona pellucida-Bindung, bei der akrosomalen Reaktion oder Fusion mit der Plasmamembran der Oozyte (Krausz et al. 1996).

Nachweismethoden von Spermatozoenfunktionen sind alleine aber für die Beurteilung der Fertilität eines Patienten nicht ausreichend.

Spermatozoenmorphologie, -motilität und -vitalität zusammen mit der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion erhöhen hingegen den Vorhersagewert von Fertilisationsraten, wobei aber eine 100%ige Korrelation nie erreicht wird (Liu und Baker 1988, 1990a, Parinaud et al. 1995a, 1995b).

Diese Aspekte deuten darauf hin, daß die in dieser Arbeit isoliert betrachtete Induktion der akrosomalen Reaktion zur Vorhersage der IVF-Ergebnisse nicht ausreichend ist.

4.4 Schlußfolgerungen

Aus den Ergebnissen können folgende Schlußfolgerungen gezogen werden:

1. Zur Induktion der akrosomalen Reaktion eignen sich Ionophor A23187 und dbcAMP gleichermaßen. Beide Protokolle sind einfach in der Handhabung und zeigen eine ähnliche Anzahl an akrosomal reagierten Spermatozoen.

2. Bei Markierung von Spermatozoen mit FITC-PSA zeigt sich eine höhere Anzahl an akrosomal reagierten Spermatozoen als bei Markierung mit FITC-ConA. Dies beruht vor allem auf einer höheren Anzahl der als „vollständig akrosomal reagiert“ identifizierten Spermatozoen.

3. Bei Markierung von Spermatozoen mit FITC-ConA ist die Unterscheidung des jeweiligen Stadiums der akrosomalen Reaktion methodisch bedingt schwieriger ist als bei Markierung mit FITC-PSA (dies gilt vor allem für die Unterscheidung „teilweise“ und „vollständig“ akrosomal reagiert).

Deshalb erscheint die Verwendung von FITC-PSA zur Darstellung der akrosomalen Reaktion in der Routinediagnostik sinnvoller als FITC-ConA.

4. Es gibt intraindividuelle Schwankungen der akrosomalen Reaktion über ein Jahr. Daher sollte bei Patienten eine mehrmalige Kontrolle der akrosomalen Reaktion, wie es auch bei der Ejakulatanalyse üblich ist, erfolgen.

5. Die Literatur zeigt widersprüchliche Ergebnisse bezüglich Korrelation zwischen Induktion der akrosomalen Reaktion und IVF-Fertilisationsraten. In den eigenen Untersuchungen kann kein Zusammenhang zwischen den beiden Parametern festgestellt werden.

Hierbei muß aber berücksichtigt werden, daß bei den meisten Patienten die Induktion der akrosomalen Reaktion im Normbereich lag.

6. Es gelang nicht, die klinische Relevanz einer Unterteilung in „teilweise“ und „vollständig akrosomal reagierte“ Spermatozoen nachzuweisen.

Durch die bestehenden Schwierigkeiten bei der Auszählung der Spermatozoen erscheint diese Unterteilung der Spermatozoen in der Routinediagnostik nicht sinnvoll.

Sie sollte zunächst wissenschaftlichen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

5. Zusammenfassung

Ein reifes Spermatozoon ist eingeteilt in Kopf, Mittelstück und Schwanz. Der anteriore Teil des Kopfes ist vom sogenannten Akrosom bedeckt, einem Vesikel, das von der äußeren und inneren akrosomalen Membran begrenzt wird. Das Akrosom enthält Enzyme, die das Spermatozoon zur Penetration durch die Zona pellucida der Eizelle befähigen. Diese Enzyme werden nach Kontakt der Spermatozoen mit der Zona pellucida durch einen exozytotischen Prozess aus dem Akrosom freigesetzt. Hierbei kommt es zur Fusion zwischen Plasmamembran und äußerer akrosomaler Membran und schließlich zur Fenestrierung der Membran. Nur akrosomal reagierte Spermatozoen können an die Plasmamembran (Oolemma) der Eizelle binden und sie befruchten.

Zur Beurteilung der Fertilisierungskapazität von Spermatozoen sind neben den Standardparametern der WHO in den letzten Jahren zunehmend auch Spermatozoenfunktionstests verwendet worden. Ein in vielen Studien überprüfter Funktionstest ist die Fähigkeit menschlicher Spermatozoen, akrosomal zu reagieren. Hierbei werden insbesondere die Ansprechraten gegenüber Induktoren der akrosomalen Reaktion beurteilt (Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion).

Da der physiologische Induktor, das Zona pellucida Protein 3, nicht in ausreichender Menge für Routinetests zur Verfügung steht und darüber hinaus zu teuer wäre, erfolgen die Stimulationstests mit chemischen Substanzen wie z.B. Calcium Ionophor oder dbcAMP.

Der Verlust der akrosomalen Kappe kann durch Färbeverfahren oder Markierungen mit fluoreszierenden Lektinen nachgewiesen werden. Lektine sind Glykoproteine pflanzlichen Ursprungs mit der Fähigkeit, an spezielle Regionen des Spermatozookopfes, z.B. den akrosomalen Inhalt oder an die akrosomale Membran, zu binden. Um diese Bindung sichtbar zu machen, werden sie mit fluoreszierendem Isocyanat (FITC) kombiniert. Hierbei wird der akrosomale Status eines Spermatozoons je nach verwendetem Lektin durch verschiedene Fluoreszenzmuster der anterioren Kopfregion dargestellt.

Unter Berücksichtigung des aus elektronenmikroskopischen Studien bekannten Ablaufes der akrosomalen Reaktion sind drei unterschiedliche Stadien von Bedeutung:

- vollständig erhaltenes Akrosom
- teilweise reagiertes Akrosom
- vollständig reagiertes Akrosom

In vergangenen Studien wurden außerdem immer wieder Korrelationen zwischen Fertilisationsraten befruchteter Eizellen in IVF-Programmen und dem Prozentsatz der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion beschrieben.

Die vorliegende Arbeit verfolgte folgende Ziele:

- Vergleich verschiedener Nachweismethoden der akrosomalen Reaktion durch Markierung der Spermatozoen mit zwei fluoreszierenden Lektinen, Pisum sativum agglutinin (FITC-PSA) und Concanavalin A (FITC-ConA).
- Differenzierung des akrosomalen Status in „teilweise“ und „vollständig“ akrosomal reagierte Spermatozoen mit Hilfe der oben genannten Lektine und Untersuchung des quantitativen Unterschiedes der mit beiden Fluoreszenzmethoden erhaltenen Ergebnisse.
- Überprüfung der klinischen Relevanz dieser Unterteilung durch Korrelation mit den Fertilisationsraten aus dem IVF-Programm.
- Vergleich zweier Stimulatoren, die die akrosomalen Reaktion induzieren (Ionophor A23187 und dbcAMP).
- Untersuchung der intraindividuellen Variabilität der akrosomalen Reaktion bei fertilen Spendern über einen Zeitraum von 1 Jahr durch wiederholte Bestimmung des akrosomalen Status und der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion.

Dabei ergaben sich folgende Ergebnisse:

- Mit den verschiedenen Markierungsmethoden (FITC-ConA bzw. FITC-PSA) ergeben sich unterschiedliche Ergebnisse bezüglich des Anteils akrosomal reagierter Spermatozoen.

Bei Markierung mit FITC-PSA wurden im Durchschnitt 10% mehr akrosomal reagierte Spermatozoen gezählt als bei Markierung mit FITC-ConA. Dieser Unterschied beruht vor allem auf einer höheren Anzahl der als „vollständig akrosomal reagiert“ identifizierten Spermatozoen. Die Anzahl der als „teilweise akrosomal reagiert“ eingestuften Spermatozoen war bei beiden Markierungen ähnlich.

Für dieses Ergebnis gibt es verschiedene Erklärungsansätze. Dazu gehören die unterschiedlichen Bindungsstellen der Lektine an das Akrosom und die verschiedenen Fixierungsmethoden der Lektine bei Markierung der Spermatozoen. Außerdem ist die

optische Festlegung der jeweiligen Stadien der akrosomalen Reaktion methodisch bedingt schwieriger bei Markierung der Spermatozoen mit FITC-ConA als bei FITC-PSA.

Die Verwendung von FITC-PSA zur Darstellung der akrosomalen Reaktion erscheint darum in der Diagnostik der akrosomalen Stadien sinnvoller als die Markierung mit FITC-ConA.

- Bei Vergleich der Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion mit den Fertilisationsraten nach IVF ergab sich entgegen anderer publizierter Studien keine Korrelation. Dies gilt ebenso für die Unterteilung der Spermatozoen in „teilweise“ und „vollständig akrosomal reagiert“.

Allerdings war das Patientenkollektiv mit 31 Patienten klein und bestand hauptsächlich aus Patienten mit guter Ejakulatqualität (Patienten mit schlechter Ejakulatqualität wurden dem ICSI-Programm zugeführt, bzw. das gesamte Ejakulat wurde zur Aufarbeitung und Befruchtung der Eizelle benötigt, so daß kein überschüssiges Ejakulat für die Untersuchungen zur Verfügung stand).

Die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion lag damit bei fast allen Patienten über 10%. In vergleichbaren Studien findet sich ein Abfall der Fertilisationsraten und damit eine Korrelation zwischen Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion und Fertilisationsraten, aber erst ab Induktionsraten unter 10% bzw. 5%. Die Diskrepanz der Ergebnisse dieser Arbeit zu den schon bekannten Studien liegt deshalb am wahrscheinlichsten in der untersuchten Population begründet.

Da es in diesem Versuch nicht gelang, eine klinische Relevanz bezüglich einer Unterteilung der Spermatozoen in „teilweise“ und „vollständig akrosomal reagierte Spermatozoen“ nachzuweisen, erscheint diese Unterteilung auch unter Berücksichtigung der methodischen Schwierigkeiten in der Routinediagnostik nicht sinnvoll. Sie sollte zunächst wissenschaftlichen Untersuchungen vorbehalten bleiben.

- Die beiden benutzten Stimulationsprotokolle (Ionophor A23187 und dbcAMP) zeigen ähnliche Ergebnisse bei der Anzahl an akrosomal reagierten Spermatozoen. Beide Methoden sind einfach zu handhaben und vom Zeitaufwand gleich schnell, so daß beide gleichermaßen für die Routinediagnostik bedeutend sind.

- In dieser Untersuchung wurden intraindividuelle Schwankungen der akrosomalen Reaktion bei gesunden Spendern gefunden. Sie bewegen sich in einem Rahmen bis zu 25%. Die Induzierbarkeit der akrosomalen Reaktion liegt dabei immer über den jeweiligen cut-off-Werten für eine eingeschränkte Spermatozoenfunktion.

Bei Untersuchungen der akrosomalen Reaktion von Patienten erscheint wegen dieser Schwankungen eine mehrmalige Kontrolle des akrosomalen Status sinnvoll, wie es schon bei der Ejakulatanalyse üblich ist.

6. Literaturverzeichnis

Aitken RJ, Ross A, Hargreave T, Richardson D, Best F (1984): Analysis of human sperm function following exposure to the ionophore A 23187.
J Androl 5: 321-329

Aitken RJ (1990): Evaluation of human sperm function.
Br Med Bull 46: 901-904

Aitken RJ, Brindle JP (1993): Analysis of the ability of three probes targeting the outer acrosomal membrane or acrosomal contents to detect the acrosome reaction in human spermatozoa.
Hum Reprod 8: 1663-1669

Aitken RJ, Buckingham DW, Fang HG (1993): Analysis of the responses of human spermatozoa to A 23187 employing a novel technique for assessing the acrosome reaction.
J Androl 14: 132-141

Aitken RJ, Paterson M, Fisher H, Buckingham DW, van Duin M (1995): Redox regulation of tyrosine phosphorylation in human spermatozoa and its role in the control of human sperm function.
J Cell Sci 108: 2017-2025

Aitken RJ, Buckingham DW, Harkiss D, Paterson M, Fisher H, Irvine DS (1996): The extragenomic action of progesterone on human spermatozoa is influenced by redox regulated changes in tyrosine phosphorylation during capacitation.
Mol Cell Endocrinol 117(1): 83-93

Aitken RJ (1997): The cell biology of fertilization.
Cell Biol Fertil 51: 291-300

American Society for Reproductive Medicine (1998): Fact sheet: In vitro fertilization.

Amin AH, Bailey JL, Storey BT, Blasco L, Heyner S (1996): A comparison of three methods for detecting the acrosome reaction in human spermatozoa.
Hum Reprod 11: 741-745

Anderson RA, Feathergill KA, De Jonge CJ, Mack SR, Zaneveld LJD (1992): Facilitative effect of pulsed addition of dibutyryl cAMP on the acrosome reaction of noncapacitated human spermatozoa.
J Androl 13: 398-408

Avrech O, Fisch B, Shalgi R (1997): Acrosomal status of human spermatozoa after follicular fluid or calcium ionophore challenge in relation to semen parameters and fertilizing capacity in vitro.
Andrologia 29: 97-101

- Barros C, Crosby JA, Moreno RD (1996): Early steps of sperm-egg interactions during mammalian fertilization.
Cell Biol Int 20: 33-39
- Bedford JM (1983): Significance of the need for sperm capacitation before fertilization in eutherian mammals.
Biol Reprod 28: 108-120
- Bielfeld P, Anderson RA, Mack SR, De Jonge CJ, Zaneveld LJD (1994): Are capacitation or calcium ion influx required for the human sperm acrosome reaction?
Fertil Steril 61: 536-541
- Bruckert E (1991): How frequent is unintentional childlessness in Germany?
Andrologia 23: 245-250
- Byrd W, Wolf DP (1986): Acrosomal status in fresh and capacitated human ejaculated sperm.
Biol Reprod 34: 859-869
- Byrd W, Tsu J, Wolf DP (1989): Kinetics of spontaneous and induced acrosomal loss in human sperm incubated under capacitating and noncapacitating conditions.
Gamete Res 22: 109-122
- Calvo L, Vantman D, Banks SM, Tezon J, Koukoulis GN, Dennison L, Sherins RJ (1989): Follicular fluid-induced acrosome reaction distinguishes a subgroup of men with unexplained infertility not identified by semen analysis.
Fertil Steril 52: 1048-1054
- Calvo L, Dennison-Lagos L, Banks SM, Dorfmann A, Thorell LP, Bustillo M, Schulman JD, Sherins RJ (1994): Acrosome reaction inducibility predicts fertilization success of in-vitro fertilization.
Human Reprod 9: 1880-1886
- Carrell DT, Middleton RG, Peterson CM, Jones KP, Urry RL (1993): Role of the cumulus in the selection of morphologically normal sperm and induction of the acrosome reaction during human in vitro fertilization.
Arch Androl 31: 133-137
- Chang MC (1984): The meaning of sperm capacitation.
J Androl 5: 45-50
- Cooper TG, Yeung CH, Nashan D, Nieschlag E (1991): Variations in semen parameters from fathers.
Hum Reprod 6: 859-866
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW (1986): Two simple methods for detecting acrosome-reacted human sperm.
Gam Res 15: 213-226

- Cross NL, Overstreet JW (1987): Glycoconjugates of the human sperm surface: distribution and alterations that accompany capacitation in vitro.
Gam Res 16: 23-35
- Cross NL, Morales P, Overstreet JW, Hanson FW (1988): Induction of acrosome reaction by the human zona pellucida.
Biol Reprod 38: 235-244
- Cross NL, Meizel S (1989): Methods for evaluating the acrosomal status of mammalian sperm.
Biol Reprod 41: 635-641
- Cross NL (1996): Effect of cholesterol and other sterols on human sperm acrosomal responsiveness.
Mol Reprod Dev 45: 212-217
- Cross NL (1998): The role of cholesterol in sperm capacitation.
Biol Reprod 59: 7-11
- Cummins JM, Pember SM, Jequier AM, Yovich JL, Hartmann PE (1991): A test of the human sperm acrosome reaction following ionophore challenge. Relationship to fertility and other seminal parameters.
J Androl 12: 98-103
- DasGupta S, Mills CL, Fraser LR (1993): Ca^{2+} -related changes in the capacitation state of human spermatozoa assessed by chlortetracycline fluorescence assay.
J Reprod Fertil 99: 135-143
- D'Cruz OJ, Haas GG (1996): Fluorescence-labeled fucoselectins are superior markers for flow cytometric quantitation of the human sperm acrosome reaction.
Fertil Steril 65: 843-851
- De Jonge CJ, Rawlins RG, Zaneveld LJD (1988): Induction of the human sperm acrosome reaction by human oocytes.
Fertil Steril 50: 949-953
- De Jonge CJ, Mack SR, Zaneveld LJD (1989): Synchronous assay for human sperm capacitation and the acrosome reaction.
J Androl 10: 232-239
- De Jonge CJ, Han HL, Lawrie H, Mack SR, Zaneveld LJD (1991a): Modulation of the human sperm acrosome reaction by effectors of the adenylate cyclase/cyclic AMP second-messenger pathway.
J Exp Zool 258: 113-125
- De Jonge CJ, Han HL, Mack SR, Zaneveld LJD (1991b): Effect of phorbol diesters, synthetic diacylglycerols, and a protein kinase C inhibitor on the human sperm acrosome reaction.
J Androl 12: 62-70

Dorjee S, Lai B, Lee G (1996): Monoclonal antibodies as probes for human sperm acrosome reaction.
Abstract book, 52. Annual Meeting of American Society for Reproductive Medicine, Boston, November 2-6, 1996: 172-173

ESHRE- Society of Human Reproduction and Embryology (1998): Male infertility update.
Hum Reprod 13: 2025-2032

Fénichel P, Donzeau M, Farahifar D, Basteris B, Ayraud N, Hsi BL (1991): Dynamics of human sperm acrosome reaction: relation with in vitro fertilization.
Fertil Steril 55: 994-999

Fierro R, Foliguet B, Grignon G, Daniel M, Bene MC, Faure GC, Barbarino-Monnier P (1996): Lectin-binding sites on human sperm during acrosome reaction: modifications judged by electron microscopy/flow cytometry.
Arch Androl 36: 187-196

Florman HM, Wassarman PM (1985): O-linked oligosaccharides of mouse egg ZP3 account for its sperm receptor activity.
Cell 41: 311

Fraser LR, Monks NJ (1990): Cyclic nucleotides and mammalian sperm capacitation.
J Reprod Fertil 42 (Suppl.): 9-21

Frenette M, Knibiehler M, Baty D, Geli V, Pattus F, Verger R, Lazdunski C (1989): Interactions of colicin A domains with phospholipid monolayers and liposomes: relevance to the mechanism of action.
Biochemistry 28: 2509-2514

Freundl G, Tiggers J (1995): Gynäkologische Endokrinologie für die Praxis.
Gustav Fischer Verlag, Jena, Stuttgart: 86

Gearon CM, Mortimer D, Chapman MG, Forman RG (1994): Artificial induction of the acrosome reaction in human spermatozoa.
Hum Reprod 9: 77-82

Haas GB, DeBault LE, D'Cruz O, Shuey R (1988): The effect of fixation and/or air-drying on the plasma and acrosomal membranes of human sperm.
Fertil Steril 50: 487-492

Haidl G, Schill WB (1992): Spermatozoenmorphologie und Fertilitätsprognose.
Hautarzt 43: 607-609

Henderson CJ, Hulme MJ, Aitken RJ (1988): Contraceptive potential of antibodies to zona pellucida.
J Reprod Fertil 83: 325

Henkel R, Müller C, Miska W, Gips H, Schill WB (1993): Determination of the acrosome reaction in human spermatozoa is predictive of fertilization in vitro.
Hum Reprod (8): 2128-2132

- Henley N, Baron C, Roberts KD (1994): Flow cytometric evaluation of the acrosome reaction of human spermatozoa: a new method using a photoactivated supravital stain.
Int J Androl 17: 78-84
- Holden CA, Hyne RV, Sathananthan AH, Trounson AO (1990): Assessment of the human sperm acrosome reaction using Concanavalin A lectin.
Mol Reprod Develop 25: 247-257
- Holden CA, Trounson AO (1992): Influence of capacitation period on human sperm acrosome loss.
J Exp Zool 264: 468-474
- Jamil K, White IG (1981): Induction of acrosomal reaction in sperm with ionophore A 23187 and calcium.
Arch Androl 7: 283-292
- Jamil K, White IG, Dwarte DM (1982): Calcium ionophore A23187 as a probe for freeze-fracture studies of membrane changes in the head of human spermatozoa.
Arch Androl 8: 1-9
- Kallajoki M, Virtanen I, Suominen J (1986): The fate of acrosomal staining during the acrosome reaction of human spermatozoa as revealed by a monoclonal antibody and PNA-lectin.
Int J Androl 9: 181-194
- Kinger S, Rajalakshmi M (1995): Assessment of the vitality and acrosomal status of human spermatozoa using fluorescent probes.
Int J Androl 18 (Suppl.1): 12-18
- Koehler JK (1981): Lectins as probes of the spermatozoon surface.
Arch Androl 6: 197-217
- Köhn FM, Mack SR, Hashish YA, Anderson RA, Zaneveld LJD (1996): Paramagnetic beads coated with Pisum sativum agglutinin bind to human spermatozoa undergoing the acrosome reaction.
Andrologia 28: 231-239
- Köhn FM, Mack SR, Schill WB, Zaneveld LJD (1997): Detection of human sperm acrosome reaction: comparison between methods using double staining, Pisum sativum agglutinin, concanavalin A and transmission electron microscopy.
Hum Reprod 12: 714-721
- Krausz C, Bonaccorsi L, Luconi M, Fuzzi B, Criscuoli L, Pellegrini S, Forti G, Baldi E (1995): Intracellular calcium increase and acrosome reaction in response to progesterone in human spermatozoa are correlated with in-vitro fertilization.
Hum Reprod 10: 120-124

- Krausz C, Bonaccorsi L, Maggio P, Luconi M, Criscuoli L, Pellegrini S, Forti G, Baldi E (1996): Two functional assays of sperm responsiveness to progesterone and their predictive values in in-vitro fertilization.
Hum Reprod 11: 1661-1667
- Kruger TF, Menkveld R, Stander FSH, Lombard CJ, Van der Merwe JP, Van Zyl JA, Smith K (1986): Sperm morphologic features as a prognostic factor in in vitro fertilization.
Fertil Steril 46: 1118-1124
- Kruger TF, Acosta AA, Simmons KF, Swanson RJ, Matta JF, Oehninger S (1988): Predictive value of abnormal sperm morphology in in vitro fertilization.
Fertil Steril 49: 112-117
- Lange R, Schneider K, Bockel B, Michelmann HW (1992): Die Bestimmung der akrosomalen Reaktion und des Spermatozoenreifegrades im Ejakulat.
Fertilität 8: 107-113
- Lee MA, Trucco GS, Bechtol KB, Wummer N, Kopf GS, Blasco L, Storey BT (1987): Capacitation and acrosome reactions in human spermatozoa monitored by chlortetracycline fluorescence assay.
Fertil Steril 48: 649-658
- Liu DY, Baker HWG (1988): The proportion of human sperm with poor morphology but normal intact acrosomes detected with *Pisum sativum* agglutinin correlates with fertilization in vitro.
Fertil Steril 50: 288-293
- Liu DY, Baker HWG (1990a): Relationship between human sperm acrosin, acrosomes, morphology and fertilization in vitro.
Hum Reprod 5: 298-303
- Liu DY, Baker HWG (1990b): Inducing the human acrosome reaction with a calcium ionophore A23187 decreases sperm-zona pellucida binding with oocytes that failed to fertilize in vitro.
J Reprod Fertil 89: 127-134
- Liu DY, Baker HWG (1992): Tests of human sperm function and fertilization in vitro.
Fertil Steril 58: 465-483
- Liu DY, Bourne H, Baker HWG (1995): Fertilization and pregnancy with acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction.
Fertil Steril 64: 116-121
- Liu DY, Baker HW (1996): A simple method for assessment on the human acrosome reaction of spermatozoa bound to the zona pellucida: lack of relationship with ionophore A23187-induced acrosome reaction.
Hum Reprod 11: 551-557

- Liu DY, Baker HW (1998): Calcium ionophor-induced acrosome reaction correlates with fertilization rates in vitro in patients with teratozoospermic semen.
Hum Reprod 13: 905-910
- Meizel S (1984): The importance of hydrolytic enzymes to an exocytic event, the mammalian sperm acrosome reaction.
Biol Rev Camb Philos Soc. 59: 125-157
- Meizel S (1985): Molecules that initiate or help stimulate the acrosome reaction by their interaction with the mammalian sperm surface.
Am J Anat 174: 285-302
- Meizel S (1995): Initiation of human sperm acrosome reaction by progesterone.
In: Fénichel P, Parinaud J (Hrsg): Human sperm acrosome reaction. Colloque Inserm Vol. 236, John Libbey Eurotext, Montrouge: 151-164
- Mendoza C, Carreras A, Moos J, Tesarik J (1992): Distinction between true acrosome reaction and degenerative acrosome loss by a one-step staining method using *Pisum sativum* agglutinin.
J Reprod Fertil 95: 755-763
- Moore HDM, Bedford JM (1983): The interaction of mammalian gametes in the female.
In: Hartman JF (Hrsg.): Mechanism and control of animal fertilization. New York Academic Press: 435-497
- Moore HDM, Smith CA, Hartmann TD, Bye AP (1987): Visualization and characterization of the acrosome reaction of human spermatozoa by immunolocalization with monoclonal antibody.
Gamete Res 17: 245-259
- Moore KL (1990): Befruchtung.
In: Embryologie, 3. Auflage, Moore (Hrsg), Schattauer-Verlag, New York
- Moreno RD, Sepulveda MS, De Ioannes A, Barros C (1998): The polysulphate binding domain of human proacrosin/acrosin is involved in both the enzyme activation and spermatozoa-zona pellucida interaction.
Zygote 6: 75-83
- Mortimer D, Curis EF, Miller RG (1987): Specific labelling by peanut agglutinin of the outer acrosomal membrane of the human spermatozoa.
J Reprod Fertil 81: 127-135
- Mortimer D, Curtis EF, Camenzind AR (1990): Combined use of fluorescent peanut agglutinin lectin and Hoechst 33258 to monitor the acrosomal status and vitality of human spermatozoa.
Hum Reprod 5: 99-103
- Nagae T, Yanagimachi R, Srivastava PN, Yanagimachi H (1986): Acrosome reaction in human spermatozoa.
Fertil Steril 45: 701-707

Niles WD, Cohen FS (1991): Video microscopy studies of vesicle-planar membrane adhaesion and fusion.

Ann N Y Acad Sci 635: 273-284

Ohashi K, Saji F, Kato M, Okabe M, Mimura T, Tanizawa O (1992): Evaluation of acrosomal status using MH61-beads test and its clinical application.

Fertil Steril 58: 803-808

Ombelet W, Maes M, Vandeput H, Cox A, Janssen M, Pollet H, Fourie FR, Steeno O, Bosmans E (1996): Chronobiological fluctuations in semen parameters with a constant abstinence period.

Arch Androl 37: 91-96

Overstreet JW, Gould JE, Katz DF, Hanson FW (1980): In vitro capacitation of human spermatozoa after passage through a column of cervical mucus.

Fertil Steril 34: 604-606

Overstreet JW, Cross NL (1988): The biology of human sperm-zona pellucida interaction.

Ann N Y Acad Sci 541: 337-345

Parinaud J, Labal B, Vieitez G, Richoilley G, Grandjean H (1993): Comparison between fluorescent peanut agglutinin lectin and GB 24 antibody techniques for the assessment of acrosomal status.

Hum reprod 8: 1685-1688

Parinaud J, Vieitez G, Moutaffian H, Richoilley G, Labal B (1995a): Relevance of acrosome function in the evaluation of semen in vitro fertilizing ability.

Fertil Steril 63: 598-603

Parinaud J, Vieitez G, Moutaffian H, Richoilley G, Labal B (1995b): Variations in spontaneous and induced acrosome reaction: correlations with semen parameters and in-vitro fertilization results.

Hum Reprod 10: 2085-2089

Parinaud J, Vieitez G, Moutaffian H, Richoilley G, Milhet P (1996): Relationship between motility parameters, morphology and acrosomal status of human spermatozoa.

Hum Reprod 11: 1240-1243

Perry RL, Naeeni M, Barratt CLR, Warren MA, Cooke ID (1995): A time course study of capacitation and the acrosome reaction in human spermatozoa using a revised chlortetracycline pattern classification.

Fertil Steril 64: 150-159

Plachot M, Mandelbaum J, Junca AM (1984): Acrosome reaction of human sperm used for in vitro fertilization.

Fertil Steril 42: 418-423

Quinn P, Kerin JF, Warnes GM (1985): Improved pregnancy rate in human in vitro fertilization with the use of a medium based on the composition of human tubal fluid.

Fertil Steril 44: 493-498

- Rhemrev J, Jeyendran RS, Vermeiden JPW, Zaneveld LJD (1989): Human sperm selection by glass wool filtration and two-layer, discontinuous Percoll gradient centrifugation. *Fertil Steril* 51: 685-690
- Russell L, Peterson RN, Freund M (1979): Morphologic characteristics of the chemically induced acrosome reaction in human spermatozoa. *Fertil Steril* 32: 87-92
- Sánchez R, Fehl P, Miska W (1995): Evaluation of the acrosome in oligozoospermic patients by simplified triple stain technique. *Andrologia* 27: 249-251
- Sathananthan AH, Trounson AO, Wood C, Leeton JF (1982): Ultrastructural observations on the penetration of human sperm into zona pellucida of the human egg in vitro. *J Androl* 3: 356-364
- Schill WB, Töpfer- Petersen E, Heissel E (1988): The sperm acrosome: functional and clinical aspects. *Hum Reprod* 3: 139-145
- Sidhu KS, Guraya SS (1989): Cellular and molecular biology of capacitation and acrosome reaction in mammalian spermatozoa. *Int Rev Cytol* 118: 231- 280
- Spungin B, Margalit, Breitbart H (1995): Sperm exocytosis reconstructed in a cell-free system: evidence for the involvement of phospholipase C and actin filaments in membran fusion. *J Cell Sci* 108: 2525-2535
- Spungin B, Breitbart H (1996): Calcium mobilization and influx during sperm exocytosis. *J Cell Sci* 109: 1947-1955
- Stock CE, Fraser LR (1987): The acrosome reaction in human sperm from men of proven fertility. *Hum Reprod* 2: 109-119
- Suarez SS, Wolf DP, Meizel S (1986): Induction of the acrosome reaction in human spermatozoa by a fraction of human follicular fluid. *Gamete Res* 14: 107-121
- Sukcharoen N, Keith J, Irvine DS, Aitken RJ (1996): Prediction of the in vitro fertilization (IVF) potential of human spermatozoa using sperm function tests: the effect of delay between testing and IVF. *Hum Reprod* 11: 1030-1034
- Takahashi K, Wetzels AMM, Goverde HJM, Bastiaans BA, Janssen HJG, Rolland R (1992): The kinetics of the acrosome reaction of human spermatozoa and its correlation with in vitro fertilization. *Fertil Steril* 57: 889-894

- Talbot P, Chacon RS (1980): A new procedure for rapidly scoring acrosome reactions of human spermatozoa.
Gamete Res 3: 211-216
- Talbot P, Chacon RS (1981): A triple-stain technique for evaluating normal acrosome reactions of human sperm.
J Exp Zool 215: 201-208
- Talbot P, Chacon RS (1982): Ultrastructural observations on binding and membrane fusion between human sperm and zona-pellucida-free hamster oocytes.
Fertil Steril 37: 240-248
- Tasdemir M, Tasdemir I, Kodama H, Tanaka T (1993): Penoxifylline-enhanced acrosome reaction correlates with fertilization in vitro.
Hum Reprod 8: 2102-2107
- Tesarik J, Drahorad J, Peknicova J (1988a): Subcellular immunochemical localization of acrosin in human spermatozoa during the acrosome reaction and zona pellucida penetration.
Fertil Steril 50: 133-141
- Tesarik J, Pilka L, Drahorad J, Cechova D, Veselsky L (1988b): The role of cumulus cell-secreted proteins in the development of human sperm fertilizing ability: implication in IVF.
Hum Reprod 3: 129-132
- Thomas P, Meizel S (1989): Phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate hydrolysis in human sperm stimulated with follicular fluid or progesterone is dependent on Ca^{2+} influx.
Biochem J 264: 539-546
- Thomas TS, Wilson WL, Reynolds AR, Oliphant G (1986): Chemical and physical characterization of rabbit sperm acrosome stabilizing factor.
Biol Reprod 35: 691-703
- Töpfer-Petersen E, Heissler E, Schill WB (1985): The kinetic of acrosome reaction - an additional sperm parameter?
Andrologia 17: 224-227
- Töpfer-Petersen E, Henschen A (1988): Zona pellucida-bindings and fucose-binding of boar sperm acrosin is not correlated with proteolytic activity.
Biol Chem 369: 69
- Trowbridge IS (1974): Isolation and chemical characterization of a mitogenetic lectin from *Pisum sativum*.
J Biol Chem 249: 6004-6012
- Van Kooij Rj, Balerna M, Roatti A, Campana A (1986): Oocyte penetration and acrosome reactions of human spermatozoa II: Correlations with other seminal parameters.
Andrologia 18: 503-508

- Van Lis MJ, Kalsbeek GL (1972): The interaction between human spermatozoa and the lectin Concanavalin A.
Andrologia 5: 45-57
- Virtanen I, Badley RA, Paasivuo R, Letho VP (1984): Distinct cytoskeletal domains revealed in sperm cells.
J Cell Biol 99: 1083-1091
- White DR, Aitken RJ (1989): Relationship between calcium, cyclic AMP, ATP and intracellular pH and the capacity of hamster spermatozoa to express hyperactivated motility.
Gamete Res. 22: 16
- White DR, Phillips DM, Bedford JM (1990): Factors affecting the acrosome reaction in human spermatozoa.
J Reprod Fertil 90: 71-80
- WHO (1988): Handbuch zur Laboruntersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermatozoen-Zervikalschleim-Interaktion.
2. Auflage, Schattauer-Verlag, Stuttgart
- WHO (1993): Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermatozoen-Zervikalschleim-Interaktion.
3. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York, London, Paris, Tokio, Hong Kong, Barcelona, Budapest
- WHO (1999): Laborhandbuch zur Untersuchung des menschlichen Ejakulates und der Spermien-Zervikalschleim-Interaktion.
4. Auflage, Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg, New York
- Williams RM, Jones R (1991): Binding of zona pellucida glycoproteins to sperm proacrosin.
Biochem Soc Trans 19: 412
- Yanagimachi R (1981): Mechanism of fertilization in mammals.
In: Fertilization and Embryonic Development In vitro. Mastroianni L, Biggers JD (Hrsg) New York, Academic Press: 81
- Yanagimachi R (1988): Sperm-egg fusion.
Curr Top Membr Transport 32: 3-43
- Yovich JM, Edirisinghe WR, Yovich JL (1994): Use of the acrosome reaction to ionophore challenge test in managing patients in an assisted reproduction program: a prospective, double blind, randomized controlled study.
Fertil Steril 61: 902-910
- Yudin AI, Gottlieb W, Meizel S (1988): Ultrastructural studies of the early events of the human sperm acrosome reaction as initiated by human follicular fluid.
Gam Res 20: 11-24

Zamboni L (1987): The ultrastructural pathology of the spermatozoon as a cause of infertility: the role of electron microscopy in the evaluation of semen quality.
Fertil Steril 48: 711-729

Zaneveld LJD, De Jonge CJ, Anderson RA, Mack SR (1991): Human sperm capacitation and the acrosome reaction.
Hum Reprod 6: 1265-1274

7. Danksagungen

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. Dr. med. habil. W.-B. Schill für die Möglichkeit der Promotion an seiner Klinik.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. F.-M. Köhn, der das Entstehen der Arbeit mit Interesse begleitete. Sein zuverlässiger Rat und seine stete Hilfsbereitschaft während der experimentellen wie theoretischen Phase waren eine wichtige und entscheidende Hilfe.

Dank gilt auch den Mitarbeitern/innen des Labors am Zentrum für Dermatologie und Andrologie der Justus-Liebig-Universität Gießen für die reibungslose Kooperation und freundliche Unterstützung während des praktischen Teiles der Arbeit, sowie Herrn Prof. Dr. med. Gips für die Möglichkeit, auf die Daten seines IVF-Programmes zurückgreifen zu dürfen.

Schließlich danke ich Herrn W. Pabst vom Institut für Medizinische Informatik der JLU Gießen für die freundliche Beratung bei der statistischen Auswertung.

Christina Thomas

Persönliche Angaben:

Familienstand: ledig
Geburtsdatum: 27.07.72
Geburtsort: Gießen
Staatsangehörigkeit: deutsch
Konfession: evangelisch

Schulbildung:

1978-1982 Grundschule in Großen-Buseck/ Hessen
1982-1989 Gesamtschule in Großen-Buseck
1989-1991 Liebigschule in Gießen
Abschluß: Allgemeine Hochschulreife (Note 1,2)

Freiwilliges soziales Jahr:

1991-1992 Tätigkeit im häuslichen Pflegedienst und Rettungsdienst
der Johanniter-Unfall-Hilfe in Gießen

Hochschulbildung:

1992-1999 Studium der Humanmedizin
Justus-Liebig-Universität, Gießen
1994 Physikum
1995 1. Staatsexamen (Note 3,0)
1998 2. Staatsexamen (Note 1,6)
1999 3. Staatsexamen (Note 1,0)

Berufserfahrung:

1993 Prüfung zur Erste-Hilfe-Ausbilderin
1996 Prüfung zur Rettungssanitäterin

Famulaturen:

1994 Anästhesie im Städtischen Krankenhaus, Bad Nauheim
1995 Allgemeinmedizin in der Praxis Dr. Becker, Hausen
1996 Unfallchirurgie im St. James Hospital, Dublin/Irland
1997 Chirurgie im Bunbury Hospital, Bunbury/Australien
1997 Gynäkologie und Geburtshilfe im St. Josephs-Krankenhaus,
Gießen
1997 Innere Medizin, Kerckhoff-Klinik, Bad Nauheim

1. Terial: Gynäkologie und Geburtshilfe, Universitätsfrauenklinik Gießen
2. Terial: Chirurgie, KKH Lich
3. Terial: Innere Medizin, KKH Lich

Tätigkeiten neben dem Studium:

1993-1995 Arbeit im Pflegedienst/ Nachtwachen in der Universitäts-
kinderklinik Gießen

1995-1999 Studentische Koordinatorin des ERASMUS- Austausch-
programmes der Europäischen Union am FB Humanmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Nebenbei Wochenenddienste beim ärztlichen Sonntagsdienst
In den Semesterferien Sprechstundenhilfenvertretung bei
Allgemeinärzten

Arbeit als Ärztin im Praktikum in der gynäkologischen Abteilung des
Nordwest-Krankenhauses in Frankfurt